Aus dem Institut für Pharmakologie der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Trendelenburg

Der Einfluß von Na^+ auf die Aufnahme von Noradrenalin ins adrenerge Neuron

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Stefan Sammet
aus Rehau

Würzburg, den 1. 12. 1979

1980

Aus dem Institut für Pharmakologie der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Trendelenburg

Der Einfluß von Na^+ auf die Aufnahme von Noradrenalin ins adrenerge Neuron

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Stefan Sammet
aus Rehau

Würzburg, den 1. 12. 1979

Referent: Privatdozent Dr. med. K.-H. Graefe

Korreferent: Professor Dr. med. U. Trendelenburg

Dekan: Professor Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 11.2.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

Quidquid agis
prudenter agas
et semper
memento finem

Meiner Frau Karin
gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

A. EINLEITUNG 1

B. METHODEN 4

1) Vorbehandlung der Tiere 4
2) Präparation des Gewebes 4
3) Lösungen 5
4) Versuchsprotokoll 6
5) Bestimmung der Radioaktivität 7
6) Mathematische und statistische Auswertung 8
7) Substanzen 10

C. ERGEBNISSE 11

1) Ermittlung der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin 11
2) Na^+-Ersatz 13
3) Zeitverlauf der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin 15
4) Abhängigkeit der Noradrenalinaufnahme von der Substratkonzentration 17
4.1. Cocainresistente Aufnahme 17
4.2. Neuronale Aufnahme 20

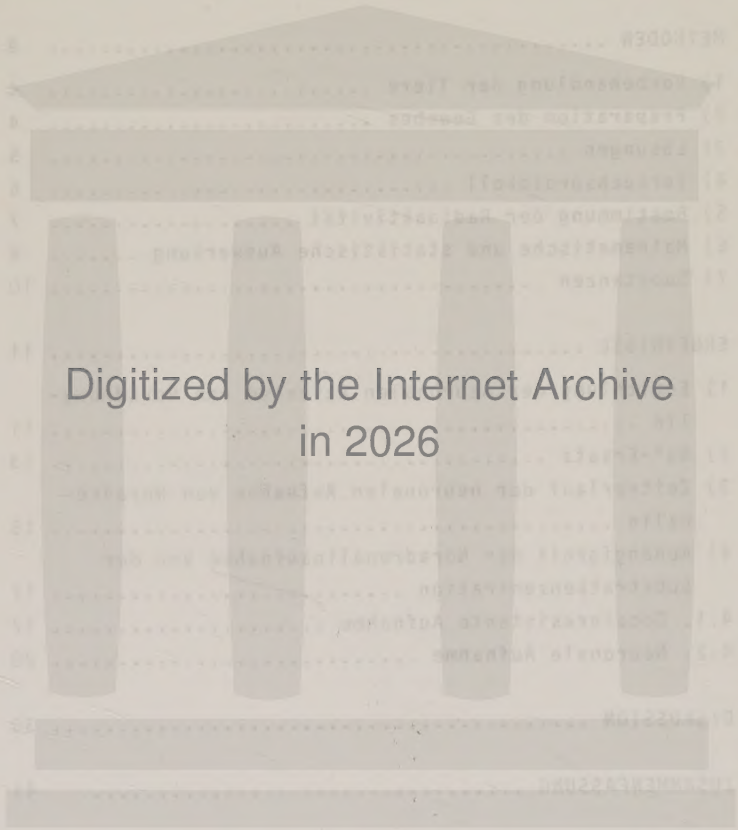
D. DISKUSSION 30

E. ZUSAMMENFASSUNG 41

LITERATURVERZEICHNIS 43

DANKSAGUNG 52

LEBENSLAUF 53



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543512_0066

A. E I N L E I T U N G

Die Gewebsaufnahme von Noradrenalin und anderer Katecholamine, für die Burn 1932 den ersten Anhalt fand, war in den beiden letzten Jahrzehnten Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Iversen, 1975).

Die ausgeprägte Anreicherung von intravenös verabreichtem ^{3}H-(-)Noradrenalin in sympathisch dicht innervierten Organen (Whitby et al., 1961) wies auf eine Aufnahme ins adrenerge Neuron hin. Diese These konnte durch Denervierungsexperimente (Strömblad und Nickerson, 1961; Thoenen und Tranzer, 1968), autoradiographische (Wolfe et al., 1962) und histochemische Untersuchungen (Hamberger et al., 1964) gesichert werden. Enzymkinetisch wurde diese sogenannte "neuronale Aufnahme" von Noradrenalin (uptake$_1$) von Iversen (1963) charakterisiert. Am perfundierten Rattenherzen fand dieser Autor für den uptake$_1$ von Noradrenalin eine Halbsättigungskonstante (K_m) von 0,3 µM und eine maximale Aufnahmegeschwindigkeit (V_{max}) von 1,2 nMol $\cdot$ g^{-1} $\cdot$ min^{-1}. Nachdem schon, trotz Denervierung von sympathisch innervierten Organen, eine Restaufnahme gefunden worden war (Fischer et al., 1965), entdeckte Iversen (1965) einen weiteren Aufnahmeprozeß, der aufgrund histochemischer Untersuchungen (Farnebo und Malmfors, 1969; Gillespie und Muir, 1970) als Aufnahme in extraneuronale Strukturen charakterisiert werden konnte ("extraneuronale Aufnahme", uptake$_2$). Die sättigungskinetischen Konstanten für den uptake$_2$ von Noradrenalin betrugen am perfundierten Rattenherzen (Iversen, 1965) 250 µM (K_m) und 100 nMol $\cdot$ g^{-1} $\cdot$ min^{-1} (V_{max}). Die kinetischen Daten für beide Transportprozesse zeigen, daß es sich um sättigungsfähige (d. h. carriervermittelte) Prozesse handelt, die in der Lage sind, das Noradrenalin gegen einen Konzentrationsgradienten durch Plasmamembranen zu schleusen (aktiver Transport). Beide unterscheiden sich im Wesentlichen dadurch, daß uptake$_1$ eine hohe Substrataffinität (kleiner K_m), aber eine relativ geringe Transportkapazität (kleine V_{max}) aufweist,

während uptake$_2$, genau umgekehrt, das Noradrenalin mit hoher Kapazität aber relativ geringer Affinität transportiert.

Beide Transportmechanismen unterscheiden sich auch dadurch, daß sie durch unterschiedliche Substanzen hemmbar sind. Ein spezifischer Hemmstoff der neuronalen Aufnahme ist das Cocain (Muscholl, 1961; Iversen, 1963), während die extraneuronale Aufnahme relativ spezifisch durch Corticosteroide gehemmt werden kann (Iversen und Salt, 1970).

Bereits 1961 wiesen Strömblad und Nickerson auf die mögliche physiologische Bedeutung der neuronalen Aufnahme für die Inaktivierung der Katecholamine nach ihrer Freisetzung als Neurotransmitter hin. Eine Bestätigung dieser Theorie erbrachten Versuche mit Hemmstoffen der neuronalen Aufnahme (z. B. Cocain und trizyklische Antidepressiva), die alle die meßbaren Mengen an freigesetztem Noradrenalin nach Stimulation sympathischer Nerven erhöhen und dadurch seine Wirkung im postsynaptischen Gewebe steigern und verlängern (Iversen, 1967; Thoenen et al., 1964 a, b). Diese Befunde machen deutlich, daß die neuronale Aufnahme im adrenergen System die gleiche Bedeutung für die Inaktivierung des freigesetzten Neurotransmitters hat, wie die Cholinesterase im cholinergen System.

Die Abhängigkeit der neuronalen Aufnahme von der Gegenwart von Na^+ in der extrazellulären Flüssigkeit (Bogdanski und Brodie, 1966; Iversen und Kravitz, 1966) zeigt die Ähnlichkeit dieses Transportmechanismus zu anderen aktiven Membrantransportprozessen, wie sie z. B. für Aminosäuren und Zucker beschrieben worden sind (Übersicht bei Crane, 1965; Schultz und Curran, 1970). Die Untersuchungen über den Membrantransport von Aminosäuren haben gezeigt, daß es in Abhängigkeit von der Struktur des Substrats ganz verschiedene Transportsysteme gibt, die sich vor allem hinsichtlich ihrer Na^+-Abhängigkeit unterscheiden. Bei den Na^+-abhängigen Systemen hat eine Verminde-

rung der Na^+-Konzentration in der extrazellulären Flüssigkeit entweder eine Zunahme des K_m's (d.h. eine Abnahme der Affinität des Carriers zum Substrat), eine Abnahme der V_{max} (d.h. eine Abnahme der Carriermobilität) oder eine Veränderung beider sättigungskinetischer Konstanten zur Folge. Für die neuronale Aufnahme des Noradrenalin ist nach den bereits vorliegenden Untersuchungen eine solche klare Aussage nicht möglich, denn die Ergebnisse dieser Untersuchungen widersprechen einander. Sugrue und Shore (1969) fanden bei Versuchen mit inkubierten Gewebsstückchen von Kaninchenherzen, daß die Na^+-Konzentration die V_{max} der neuronalen Aufnahme beeinflußt, während Bogdanski et al. (1970) an Synaptosomen von Kaninchengehirnen diese Beobachtung nicht bestätigen konnten, aber einen Einfluß auf den K_m feststellten.

Einige Jahre später berichteten White und Paton (1972), daß die Na^+-Konzentration im Inkubationsansatz einen gewissen Einfluß auf die V_{max} der Noradrenalin-Aufnahme in Synaptosomen von Rattengehirnen hat, die Aufnahme aber auch ohne Na^+ (allerdings mit verminderter Geschwindigkeit) funktioniert. Diese sich widersprechenden Ergebnisse sind sicherlich zum Teil auf methodische Probleme zurückzuführen, denn es ist erwiesenermaßen problematisch, initiale Aufnahmeraten für Noradrenalin in sympathische Nervenenden exakt zu messen (Obersicht bei Iversen, 1967; Graefe, 1976), d.h. z.B. die neuronale Aufnahme von der stets gleichzeitig stattfindenden extraneuronalen Aufnahme zu trennen.

Ziel dieser Arbeit ist es darum, an einem sympathisch dicht innervierten Organ, unter möglichst sorgfältiger Vermeidung aller Störfaktoren, das Verhalten der kinetischen Parameter der Michaelis-Menten-Gleichung in Abhängigkeit von der Na^+-Konzentration zu untersuchen und so nähere Aufschlüsse darüber zu erhalten, auf welche Weise Na^+ als Cofaktor an der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin beteiligt ist.

B. METHODEN

1) Vorbehandlung der Tiere

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 200 und 400 g, durchschnittlich etwa 250 g. Die Ratten erhielten 18 bis 20 h vor dem Versuch 5 mg/kg und 2 bis 3 h vor dem Versuch 2,5 mg/kg Reserpin in Form einer s.c. Injektion. Diese Vorbehandlung mit Reserpin hatte zum Ziel, die endogenen Noradrenalin-Speicher zu entleeren und die Aufnahme von exogenem Noradrenalin (^{3}H-Noradrenalin) in die Noradrenalin-Speichervesikel zu hemmen. Außerdem erhielten die Tiere 2 bis 3 h vor dem Versuch 100 mg/kg Pargylin s.c., um die Monoaminoxidase zu hemmen. Das zweite Enzym, das für den Abbau von Noradrenalin verantwortlich ist, die Catechol-O-methyltransferase, wurde mit Hilfe von 3',4'-Dihydroxy-2-methylpropiophenon (U-0521; Giles und Miller, 1967) gehemmt, das dem Inkubationsmedium während des ganzen Versuches zugesetzt wurde (0,1 mM). Während Reserpin (Serpasil^R) nicht länger als 4 Wochen in Form einer Stammlösung (10 mg/ml 20 %-ige Ascorbinsäure) im Kühlschrank aufbewahrt wurde, wurde Pargylin vor jedem Versuch frisch in aqua bidest. gelöst (200 mg/ml).

2) Präparation des Gewebes

Die Tiere wurden durch einen Schlag auf den Kopf betäubt und anschließend durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet.

Nach Eröffnung des Abdomens durch einen kreisförmigen Schnitt wurden die Samenleiter möglichst weitgehend von Serosa und adventitiellem Bindegewebe befreit. Ihre etwa 10 mm langen Mittelteile wurden in situ der Länge nach gespalten, herausgeschnitten und nach Entfernung der Mucosa längsgeteilt. Diese Methode gestattete es, aus den beiden Samenleitern einer Ratte

vier nahezu gleichwertige Gewebsproben zu erhalten. Auf die Vorteile dieses Vorgehens wird noch einzugehen sein. Der Mittelteil des Samenleiters wurde verwendet, weil aus den Untersuchungen von Zieher und Jaim-Etcheverry (1971) bekannt ist, daß der endogene Noradrenalin-Gehalt des Samenleiters (und damit die Dichte der adrenergen Innervation) vom epididymalen zum prostatischen Ende stark zunimmt und nur im mittleren Bereich über eine gewisse Strecke konstant bleibt.

Nach der Präparation wurden die Gewebsproben zwischen Löschpapier abgetupft und noch vor Inkubationsbeginn gewogen. Anschließend wurden sie mit Fäden frei beweglich an Plastikstäbchen befestigt und in kalte Krebslösung überführt. In dieser mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 gesättigten Lösung, in der die Proben schon während der Präparation gehalten worden waren, verblieben sie bis zum Inkubationsbeginn.

3) Lösungen

Die verwendete Inkubationslösung nach Krebs wurde für jeden Versuch frisch angesetzt. Sie enthielt (mM): NaCl 118,1; KCl 4,7; $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ 1,9; KH_2PO_4 1,18; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 1,18; $NaHCO_3$ 25,0; D-Glucose 5,0. Außerdem wurden der Lösung zum Schutz des Noradrenalins vor Autoxidation Na_2EDTA (0,04 mM) und Ascorbinsäure (0,57 mM), sowie U-0521 (0,1 mM; s. oben) zur Hemmung der Catechol-O-methyltransferase zugesetzt.

Um die Na^+-Konzentration in der Krebslösung zu vermindern, wurde das NaCl (und in einigen Versuchen auch das $NaHCO_3$) stufenweise durch isosmolare Mengen von Cholinchlorid, LiCl, TrisHCl oder Saccharose (Cholinhydrogencarbonat oder $TrisH_2CO_3$) ersetzt. Mit Ausnahme von Cholinhydrogencarbonat, $TrisH_2CO_3$ und TrisHCl wurden alle Ersatzmittel in Substanz eingewogen. Cholinhydrogencarbonat lag als 80 %-ige wäßrige Lösung vor (Fluka AG). $TrisH_2CO_3$ wurde als 1 M Lösung selbst hergestellt,

indem 1 M Trislösung solange mit CO_2 begast wurde, bis ein pH von 7,4 erreicht war. In ähnlicher Weise erfolgte die Herstellung von 1 M TrisHCl (pH 7,4) aus einer Lösung von Tris und konzentrierter HCl.

4) Versuchsprotokoll

Die Inkubation der Samenleiter erfolgte in Zentrifugenröhrchen, die 4 ml Inkubationsmedium enthielten. Vom Boden der Inkubationsröhrchen aus wurde das Medium kräftig mit einem Gemisch aus 95 % O_2 und 5 % CO_2 durchperlt. Zunächst wurden die Samenleiter 30 min in aminfreier Lösung vorinkubiert. Dies geschah 15 min lang mit normaler Krebslösung (d.h., die Na^+-Konzentration war 143 mM). Die folgenden 15 min wurden die Gewebsproben einem Medium ausgesetzt, das bezüglich der Na^+-Konzentration und der zugesetzten Pharmaka genau dem Noradrenalin-haltigen Testmedium entsprach, in dem die Samenleiter nach der Vorinkubation inkubiert wurden.

Das Testmedium für die Inkubation enthielt 0,6 µCi/ml ^3H-(-) Noradrenalin (spezifische Aktivität = 2,2 bis 4,2 Ci/mMol) und 0,2 µCi/ml ^{14}C-Sorbit (spezifische Aktivität = 200 mCi/mMol). Das radioaktive Noradrenalin wurde durch Zusatz verschiedener Konzentrationen von nicht markiertem Amin (1 bis 30 µM) nach Bedarf verdünnt. Die Sorbitkonzentration im Medium wurde durch Zusatz von "kaltem" Sorbit in allen Versuchen auf 0,05 mM eingestellt. Der Sorbitzusatz zum Inkubationsmedium diente der Bestimmung des Extrazellulärraumes im Gewebe (Morgan et al., 1971), mit dessen Hilfe eine Korrektur der Noradrenalinaufnahme in das Gewebe mit der im Extrazellulärraum verteilten Noradrenalinmenge möglich war.

Die Versuchsanordnung war stets so, daß unter sonst identischen Versuchsbedingungen eine der beiden Hälften eines Samenleiters ohne und die andere mit 100 µM Cocain inkubiert wurde.

Da Cocain ein selektiver Hemmstoff der neuronalen Noradrenalinaufnahme ist (siehe Einleitung), war es möglich, auf diese Weise in einem einzigen Samenleiter die neuronale Aufnahme des Noradrenalins aus der Differenz zwischen der Gesamtaufnahme (Inkubation ohne Cocain) und der cocainresistenten Aufnahme (Inkubation mit Cocain) zu bestimmen. Die verwendete Cocainkonzentration ist mindestens um den Faktor 100 höher als die Inhibitorkonstante des Cocains bezüglich der Hemmung der neuronalen Aufnahme (Iversen, 1967). In einigen Versuchen wurde die extraneuronale Aufnahme von Noradrenalin durch 87 µM Corticosteron (Iversen und Salt, 1970) und die extraneuronale Bindung von Noradrenalin an Bindegewebsfasern durch 100 µM Oxytetracyclin (Powis, 1973) gehemmt. Alle diese Hemmstoffe wurden dem Medium während der letzten 15 min der Vorinkubation und während der Inkubation zugesetzt.

Um die Temperaturabhängigkeit der cocainresistenten Noradrenalinaufnahme zu prüfen, wurden einige Samenleiter bei ca. 1 °C inkubiert. Zu diesem Zweck wurde das Inkubationsmedium in einem Eisbad auf diese Temperatur abgekühlt.

Sofort nach Beendigung der Inkubation (1 bis 8 min) wurde die zelluläre Noradrenalinaufnahme dadurch gestoppt, daß die Gewebsproben 20 s in eiskalter Krebslösung abgespült wurden.

Anschließend wurden die Gewebe von den Plastikstäbchen entfernt, kräftig zwischen zwei Blättern Filterpapier getrocknet, in Zählfläschchen überführt und in 1 ml Soluene^{R} (Fa. Packard) bei 50 °C solubilisiert. Die Radioaktivität von Gewebsproben und Teilvolumina der Inkubationslösungen wurde mittels Flüssigkeitsscintillationsmessung bestimmt.

5) Bestimmung der Radioaktivität

Der Gehalt der Proben an ^{3}H und ^{14}C wurde mit Hilfe eines TRI-CARB-Flüssigkeitsscintillationszählers, Modell 3390/544 der Fa.

Packard, gemessen. Die Teilvolumina der Inkubationsbäder wurden mit 6 ml und die aufgelösten Gewebsproben mit 10 ml eines Scintillatorcocktails folgender Zusammensetzung vermischt: 600 ml Toluol, 300 ml Triton X-100, 100 ml 98 % Äthanol, 20 ml 1 N HCl, 5 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 0,1 g Dimethyl-1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-Benzol (Dimethyl-POPOP) (Graefe et al., 1973).

Die Simultanmessung von ^{3}H und ^{14}C wurde mit der vom Hersteller empfohlenen Einstellung des Gerätes vorgenommen. Sie gewährleistete einerseits, daß die im ^{3}H-Kanal gemessene Radioaktivität um die hier mit erscheinende ^{14}C-Aktivität vermindert wurde, und andererseits, daß die im ^{3}H- und ^{14}C-Kanal gezählten Zerfälle/min (cpm) mit Hilfe der automatischen externen Standardisierung auf die absoluten Zerfälle/min (dpm) hochgerechnet wurden. Die mittlere Zählausbeute betrug für ^{3}H 24 % und für ^{14}C 40 %. Die Proben wurden solange gezählt, bis die Standardabweichung der Zählrate kleiner als 1,5 % war.

6) Mathematische und statistische Auswertung

Die in Text und Abbildungen angegebenen Mittelwerte sind arithmetische Mittel ($\bar{x}$) mit dem mittleren Fehler des Mittelwertes ($S_{\bar{x}}$) als Streuung. n gibt die Anzahl der Versuche wieder. Regressions- und Korrelationsanalysen wurden nach den üblichen statistischen Methoden berechnet (Snedecor und Cochran, 1967). Die Signifikanz von Unterschieden zwischen Mittelwerten wurde mit Hilfe des t-Tests nach Student oder des t-Tests für gepaarte Stichproben überprüft. Ein Unterschied wurde als signifikant angesehen, wenn $P < 0{,}05$ war. Für den Vergleich von Kurven wurde die Varianzanalyse nach Winne (1965) angewendet.

Die Sättigungsfunktionen, die die initiale Noradrenalin-Aufnahmegeschwindigkeit als Funktion der Noradrenalin- oder Na^{+}-Konzentration im Inkubationsmedium beschreiben, wurden nach der

Methode von Wilkinson (1961) ausgewertet. Dabei werden die experimentellen Daten der Sättigungskurve mit Hilfe eines iterativen Verfahrens durch Minimalisierung der quadratischen Abweichung direkt an die Michaelis-Menten-Gleichung angepaßt:

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

(v = initiale Aufnahmerate in $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$; S = Konzentration von Noradrenalin oder Na^+ im Inkubationsmedium in µM oder mM; V_{max} = maximale Aufnahmegeschwindigkeit in $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$; K_m = Halbsättigungskonstante, d.h. die Konzentration von S bei der $v = V_{max}/2$). Die Analyse nach Wilkinson (1961) liefert K_m- und V_{max}-Werte mit den zugehörenden $S_{\bar{x}}$-Werten. Der graphische Test, ob die Ergebnisse der Michaelis-Menten-Gleichung gehorchen, wurde mit der Methode von Lineweaver und Burk (1934) durchgeführt, d.h., es wurde geprüft, ob sich eine lineare Beziehung zwischen $^1/v$ und $^1/S$ ergibt.

Zur Berechnung der Noradrenalin-Aufnahme in das Gewebe wurde mit Verteilungsräumen operiert, die sich aus der Beziehung

$$\frac{nMol/g\ Gewebe}{nMol/ml\ Bad}$$

mit der Einheit ml/g ergaben. Dabei wurde der ^3H-Noradrenalin-Verteilungsraum (nach Subtraktion des ^{14}C-Sorbitraumes) mit der Konzentration von Noradrenalin im Inkubationsbad multipliziert. Dies geschah in der Annahme, daß die Verteilung des Sorbits, aufgrund seines ähnlichen Molekulargewichts (182), die extrazelluläre Verteilung von Noradrenalin (169) widerspiegelt. Außerdem wurde angenommen, daß (nach Hemmung der das Noradrenalin metabolisierenden Enzyme) der ^3H-Gehalt des Gewebes der Noradrenalin-Aufnahme in das Gewebe entspricht.

Bei einem Teil der Versuche wurde auf die Bestimmung des Extrazellulärraumes mit ^{14}C-Sorbit verzichtet. Dieses Vorgehen erscheint gerechtfertigt, da der ^{14}C-Sorbitraum im Gewebe durch die Anwesenheit von Cocain nicht beeinflußt wurde (Sorbitraum nach 1 min Inkubation in Gegenwart von Cocain = 0,149 $\pm$ 0,002 $ml \cdot g^{-1}$ und Inkubation in Abwesenheit von Cocain = 0,146 $\pm$ 0,002 $ml \cdot g^{-1}$; n jeweils = 218), so daß durch Subtraktion der cocainresistenten Aufnahme von der Gesamtaufnahme, auch ohne Korrektur der beiden Meßgrößen mit dem Extrazellulärraum, die neuronale Aufnahme von Noradrenalin berechnet werden konnte.

7) Substanzen

Cocainhydrochlorid (Fa. E. Merck, Darmstadt); Corticosteron (Fa. E. Merck, Darmstadt); 3,4-Dihydroxy-2-methylpropiophenon (U-0521, Upjohn Company); D(-)Noradrenalin (Farbwerke Hoechst AG); ^{3}H-(-)Noradrenalin (2,2 bis 4,2 Ci/mMol, NEN Chemicals); Oxytetracyclin; Pargylinhydrochlorid (Fa. Abbot, Belgien); Reserpin (Serpasil^{R}, Ciba-Geigy GmbH); Soluene^{R} (Fa. Packard; ^{14}C-D-Sorbit (200mCi/mMol, NEN-Chemicals); D-Sorbit (Fa. E. Merck, Darmstadt).

Alle verwendeten Chemikalien wiesen einen "pro analysi"-Reinheitsgrad auf.

C. ERGEBNISSE

1) Ermittlung der neuronalen NA-Aufnahme von Noradrenalin

Zunächst sollte die Frage untersucht werden, welche der in der Einleitung geschilderten Prozesse der Noradrenalin-Aufnahme an dem Transport in das vas deferens der Ratte beteiligt sind. Zur Differenzierung dieser Prozesse (uptake$_1$ oder uptake$_2$) wurden Hemmstoffe verwendet. Cocain, als Hemmstoff der neuronalen Aufnahme wohlbekannt (Muscholl, 1961; Iversen, 1963), wurde in einer Konzentration von 100 µM verwendet. Diese Konzentration sollte die neuronale Aminaufnahme auch bei hohen Substratkonzentrationen praktisch vollständig hemmen, denn der K_i-Wert dieser Substanz für die Hemmung der neuronalen Aufnahme liegt in den verschiedensten Geweben zwischen 0,4-5 µM (Iversen, 1967; Berti und Shore, 1967; Jarrott, 1970; Graefe und Eckert, 1972; Graefe et al., 1978). Als Hemmstoff des uptake$_2$ wurde Corticosteron in einer Konzentration von 87 µM verwendet. Diese Substanz hemmt, nach Iversen und Salt, 1970, selektiv die extraneuronale Aufnahme von Noradrenalin in das perfundierte Rattenherz.

Cocain hemmte sowohl bei einer Na^+-Konzentration von 143 als auch von 25 mM die Aufnahme von Noradrenalin in das vas deferens der Ratte, während Corticosteron bei beiden Na^+-Konzentrationen praktisch keine Wirkung zeigte (Abb. 1a und b). Die hemmende Wirkung von Cocain war bei 25 mM Na^+ deutlich geringer ausgeprägt, als bei 143 mM Na^+. Die in Gegenwart von Cocain beobachtete Aufnahme (im Folgenden als cocainresistente Aufnahme bezeichnet) war bei beiden Na^+-Konzentrationen annähernd gleich (vgl. Abb. 1a und b). Auf diesen Befund soll später noch genauer eingegangen werden. Die cocainresistente Aufnahme sollte vornehmlich durch uptake$_2$ zustandekommen und deshalb durch Corticosteron hemmbar sein. Aus Abb. 1 geht jedoch eindeutig hervor, daß Corticosteron weder bei 143 mM noch bei 25 mM Na^+

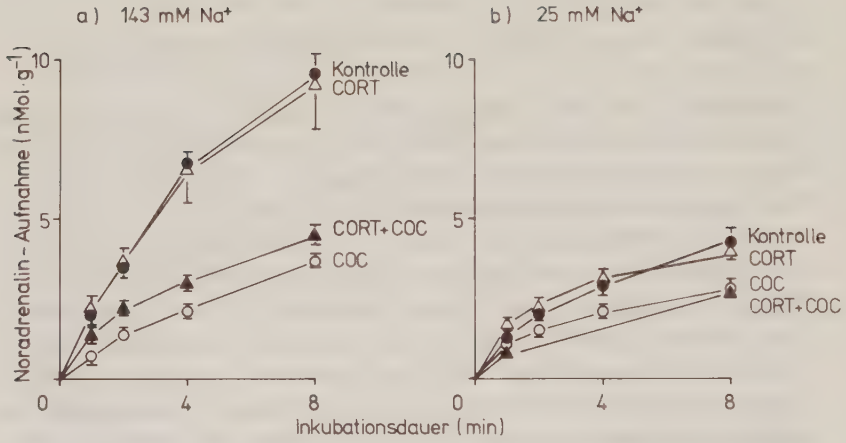


Abb. 1a und b

Einfluß von Cocain und Corticosteron auf die Noradrenalin-Aufnahme in den Ductus deferens der Ratte.

Ordinaten: Akkumulation von Noradrenalin im Gewebe in $nMol \cdot g^{-1}$. Abszissen: Dauer der Inkubation in min. Halbierte Ductus deferentes von mit Reserpin vorbehandelten Tieren (Monoaminoxidase und Catechol-O-methyltransferase gehemmt) wurden bei 37 °C mit 6,1 µM ^{3}H-(-)Noradrenalin und 0,054 mM ^{14}C-Sorbit inkubiert. Die Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium betrug 143 mM (a; normale Krebs-Lösung) oder 25 mM (b; 118 mM NaCl durch LiCl ersetzt). Die Sorbit-Aufnahme in das Gewebe diente der Korrektur der Amin-Aufnahme mit dem extrazellulär verteilten Amin. Die Inkubation wurde in Abwesenheit (Kontrolle; ●–●) oder in Gegenwart von 87 µM Corticosteron (CORT; △–△), 100 µM Cocain (COC; o-o) oder CORT plus COC (▲-▲) durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) von mindestens 4 Versuchen.

einen hemmenden Einfluß auf die cocainresistente Aufnahme von Noradrenalin hatte.

Die cocainresistente Aufnahme (bei einer Substratkonzentration von 6,1 µM und einer Na^+-Konzentration von 25 mM gemessen) wies eine gewisse Temperaturabhängigkeit auf. Bei einer Temperatur von 1°C wurden, nach einer Inkubationsdauer von 1 min (8 min), 73,4 $\pm$ 7,2 % (73,7 $\pm$ 3,4 %) der Noradrenalin-Menge aufgenommen, die bei 37 °C gemessen wurden (n = 4; gepaarter t-Test: $P < 0,05$ für 1 min, $P < 0,005$ für 8 min). Da Powis (1973) berichtet hatte, daß Tetracycline die Bindung von Katecholaminen an Kollagen und Elastin zu hemmen vermögen, wurde der Einfluß von 100 µM Oxytetracyclin auf die cocainresistente Aufnahme unter den gerade geschilderten Bedingungen untersucht. Oxytetracyclin hatte weder nach einer Inkubationsdauer von 1 min, noch nach 8 min, eine Hemmung der cocainresistenten Aufnahme zur Folge. Die 1-min-Aufnahme bzw. 8-min-Aufnahme betrug in Gegenwart von Oxytetracyclin 94,2 $\pm$ 2,7 % (n = 4; gepaarter t-Test: $P < 0,1$), bzw. 102,2 $\pm$ 4,8 % (n = 4), der Kontrollaufnahme.

Die geschilderten Versuchsergebnisse machen deutlich, daß eine Bestimmung der neuronalen Noradrenalin-Aufnahme eigentlich nur durch eine parallele Messung der Gesamtaufnahme und der cocainresistenten Aufnahme und nachfolgende Subtraktion der cocainresistenten von der Gesamtaufnahme möglich ist. Deshalb wurde in allen folgenden Versuchen die eine Hälfte eines längshalbierten vas deferens in Abwesenheit, die andere Hälfte in Gegenwart von 100 µM Cocain inkubiert und die neuronale Noradrenalin-Aufnahme durch Differenzbildung ermittelt.

2) Na^+-Ersatz

Die bisher bei Studien des Membrantransports von gelösten Stoffen unter anderem als Na^+-Ersatz verwendeten Ionen Li^+, $Tris^+$,

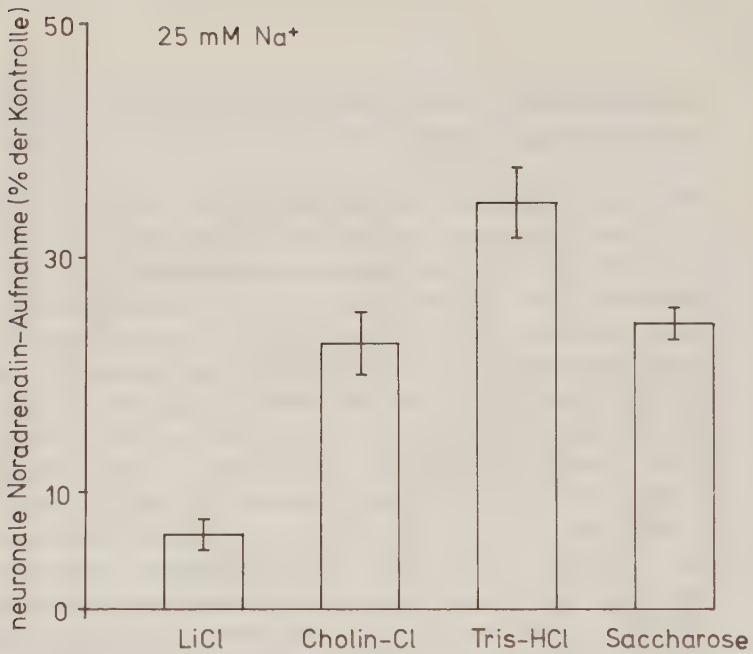


Abb. 2

Einfluß verschiedener Na^+-Ersatzstoffe auf die neuronale Aufnahme von Noradrenalin bei einer Na^+-Konzentration von 25 mM; Ductus deferens der Ratte. Höhe der Säulen: initiale neuronale Noradrenalin-Aufnahmerate in % der Kontrolle (143 mM Na^+). Halbierte Ductus deferentes von mit Reserpin vorbehandelten Tieren (Monoaminoxidase und Catechol-O-methyltransferase gehemmt) wurden bei 37 °C mit 3,1 µM ^{3}H-(-)Noradrenalin 1 min lang inkubiert. Die eine Hälfte des Samenleiters wurde ohne, die andere mit 100 µM Cocain (zur Hemmung der neuronalen Aufnahme) inkubiert. Aus der Differenz zwischen der Noradrenalin-Aufnahme mit und der ohne Cocain im Inkubationsmedium ergab sich die neuronale Noradrenalin-Aufnahme. Bei diesem Verfahren zur Bestimmung der neuronalen Aufnahme erübrigt sich die Korrektur mit der im Extrazellulärraum verteilten Noradrenalin-Menge, denn die cocainresistente Aufnahme schließt diese (etwa 70 % der cocainresistenten Aufnahme) mit ein. In einem Samenleiter eines jeden Tieres wurde die neuronale Aufnahme bei 143 mM Na^+ (Kontrolle) und im anderen Samenleiter bei 25 mM Na^+ gemessen (118 mM NaCl durch isosmolare Konzentrationen von LiCl, CholinCl, TrisHCl oder Saccharose ersetzt). Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) von mindestens 4 Versuchen. Die Kontrollaufnahme betrug 1,187 $\pm$ 0,087 $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ (n = 19). Die Unterschiede zwischen den Säulen sind (ausgenommen "CholinCl" gegen "Saccharose") signifikant (t-Test; $P <$ 0,05 bis 0,001).

$Cholin^+$ (sowie Saccharose) wurden in einer gesonderten Versuchsreihe bei einer Na^+-Konzentration von 25 mM und einer Noradrenalin-Konzentration von 3,1 µM getestet. Dabei zeigte sich, daß Lithium eine über den Na^+-Mangel hinausgehende hemmende Wirkung auf die neuronale Noradrenalin-Aufnahme hatte, da die in Gegenwart von 118 mM LiCl inkubierten Samenleiter deutlich weniger Noradrenalin aufgenommen hatten als die, die in Gegenwart isosmolarer Konzentrationen von TrisHCl, CholinCl oder Saccharose inkubiert worden waren (Abb. 2). Zur Erhärtung der Signifikanz dieses Ergebnisses sei erwähnt, daß bei dieser Versuchsgruppe die Kontrolle mit normaler Na^+-Konzentration (143 mM) am einen und die Noradrenalin-Aufnahme bei reduzierter Na^+-Konzentration (25 mM) am anderen Samenleiter eines Tieres gemessen wurden (n = 4 bis 6).

Die starke inhibitorische Wirkung von Li^+ war der Grund dafür, daß in den folgenden Versuchen $Cholin^+$ und $Tris^+$ als Na^+-Ersatz verwendet wurden. Saccharose schied von vorne herein als Ersatz für NaCl aus, da in saccharosehaltigen Lösungen auch die Chloridkonzentration vermindert worden wäre. Auf dieses Problem wird in der Diskussion noch näher eingegangen werden.

3) Zeitverlauf der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin

Da die Michaelis-Menten-Gleichung, mit deren Hilfe die Na^+-Abhängigkeit der neuronalen Aufnahme näher charakterisiert werden soll, auf den Membrantransport gelöster Stoffe nur dann angewendet werden kann, wenn initiale Transportraten (d.h. Geschwindigkeiten für den unidirektionalen Einwärtstransport) gemessen werden, wurde untersucht, wie lange die aufgenommene Noradrenalinmenge linear mit der Zeit zunimmt.

In einer Gruppe von Versuchen (Noradrenalin-Konzentration = 6,1 µM; Na^+-Ersatz durch $Cholin^+$) war die Noradrenalin-Aufnahme bis zur 2. min linear (Abb. 3). Auch Versuche mit $Tris^+$ als Na^+-

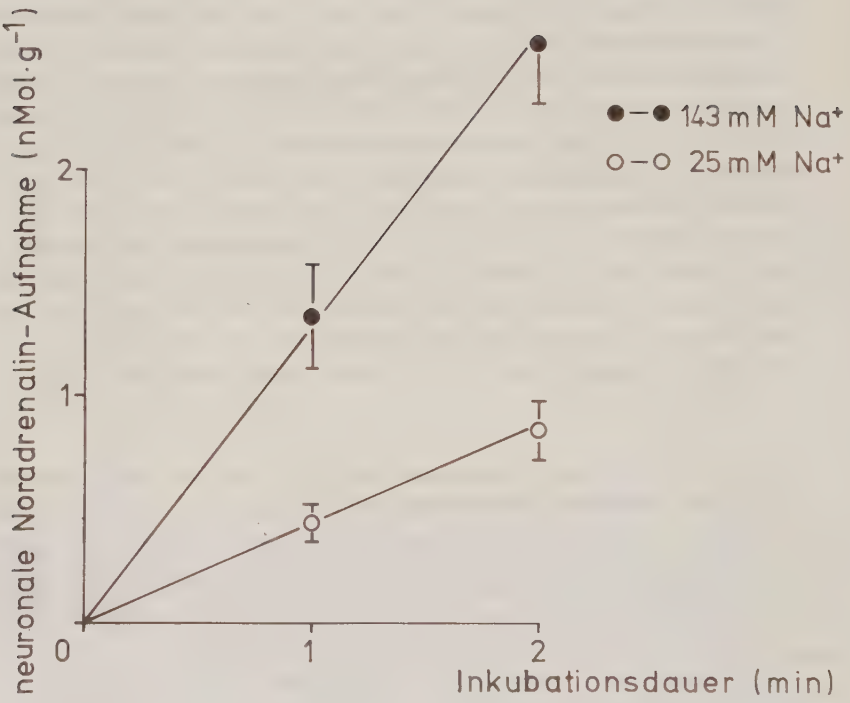


Abb. 3

Einfluß der Inkubationsdauer auf die Noradrenalin-Aufnahme in den Ductus deferens der Ratte.

Ordinate: Neuronale Aufnahme von Noradrenalin in $nMol \cdot g^{-1}$. Abszisse: Inkubationsdauer in min. Halbierte Ductus deferentes wurden mit 6,1 µM ^{3}H-(-)Noradrenalin und mit 143 oder 25 mM Na^+ (Na^+-Ersatz durch Cholin$^+$) inkubiert. Die experimentellen Bedingungen und die Methode zur Bestimmung der neuronalen Aufnahme sind in der Legende zu Abb. 2 beschrieben. Gezeigt sind die Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus mindestens 6 Versuchen.

Ersatz haben ergeben, daß bei einer Na^+-Konzentration von 20 mM der Zeitverlauf der Noradrenalin-Aufnahme für mindestens 2 min linear ist (Keller und Graefe, 1979; Sammet und Graefe, 1979). Deshalb wurde für alle weiteren Versuche eine Inkubationsdauer von 1 min gewählt. Man darf annehmen, daß bei diesem Vorgehen für alle verwendeten Noradrenalin-Konzentrationen initiale Aufnahmeraten gemessen wurden.

4) Abhängigkeit der Noradrenalin-Aufnahme von der Substratkonzentration

4.1. Cocainresistente Aufnahme

Die cocainresistente Noradrenalin-Aufnahme (d.h., die Aufnahme in Gegenwart von 100 µM Cocain) wurde für verschiedene Noradrenalin-Konzentrationen in einem Bereich von 1 bis 30 µM bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die cocainresistente Aufnahme sowohl bei 143 mM Na^+, als auch in Na^+-freiem Inkubationsmedium linear von der Noradrenalin-Konzentration abhing, d.h. nicht sättigungsfähig war (Abb. 4a und b). Darüberhinaus fiel auf, daß in diesen Versuchsserien das Fehlen von Na^+ im Inkubationsmedium ohne wesentlichen Einfluß auf die cocainresistente Aufnahmekomponente blieb (Abb. 4a und 4b). Eine solche Aussage ist nicht nur für Na^+-freie Lösungen gültig, sondern auch für Lösungen mit unterschiedlichen Na^+-Konzentrationen (Abb. 5). Aus Abb. 4b wird außerdem deutlich, daß die Na^+-unabhängige Noradrenalin-Aufnahme in Abwesenheit von Cocain praktisch identisch war mit der cocainresistenten Aufnahme, unabhängig davon, ob mit oder ohne Na^+ im Inkubationsmedium. Weder in Abb. 4a, noch in Abb. 4b ergaben sich varianzanalytisch Unterschiede zwischen den gezeigten Geraden. Andere Versuche bestätigten, daß die cocainresistente Aufnahme auch unabhängig davon war, ob $Cholin^+$ oder $Tris^+$ als Na^+-Ersatz verwendet wurden. Diese Behauptung stützt sich auf 33 gepaarte Versuche, in denen die cocainresistente Aufnahme von Noradrenalin bei 6 µM ^{3}H-Noradrenalin in Gegenwart steigender Konzentrationen von CholinCl bzw. TrisHCl (15 bis 100 mM) gemessen wurde. In die-

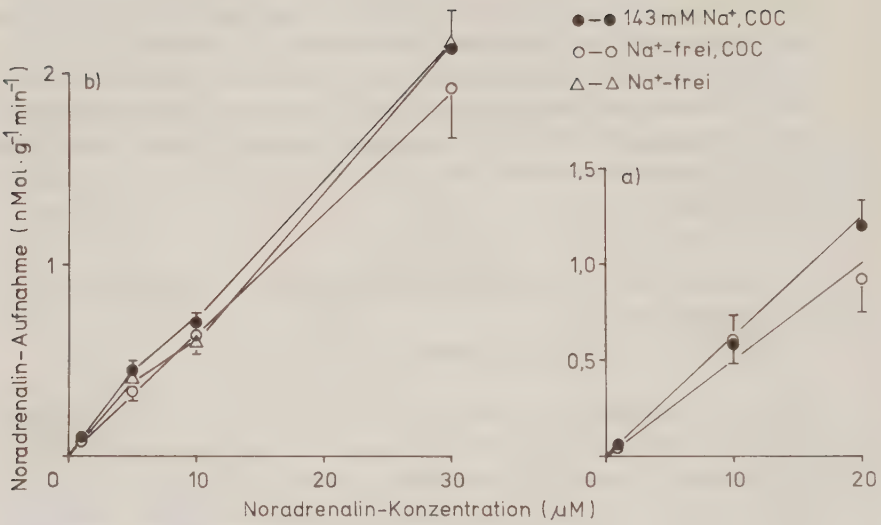


Abb. 4a und b

Cocainresistente bzw. Na^+-unabhängige Aufnahme von Noradrenalin; Ductus deferens der Ratte.

Ordinaten: Initiale Noradrenalin-Aufnahmerate in $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ (korrigiert mit dem extrazellulär verteilten Amin). Abszissen: Noradrenalin-Konzentration im Inkubationsmedium in µM. Halbierte Ductus deferentes wurden bei verschiedenen ^3H-(-)Noradrenalin-Konzentrationen (1 bis 30 µM) in Gegenwart von 0,054 mM ^{14}C-Sorbit für 1 min inkubiert. Das Inkubationsmedium enthielt entweder 143 mM Na^+ plus 100 µM Cocain (COC), kein Na^+ plus COC oder kein Na^+. In den Na^+-freien Lösungen wurde das Na^+ durch Cholin$^+$ (a) oder Tris$^+$ (b) ersetzt. Die übrigen experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Abb. 2 beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) von mindestens 4 (Abb. 4a) bzw. 7 Versuchen (Abb. 4b). Varianzanalytisch (Winne, 1965) unterschieden sich weder die beiden Geraden von Abb. 4a, noch die drei Geraden von Abb. 4b (F stets kleiner als 0,6).

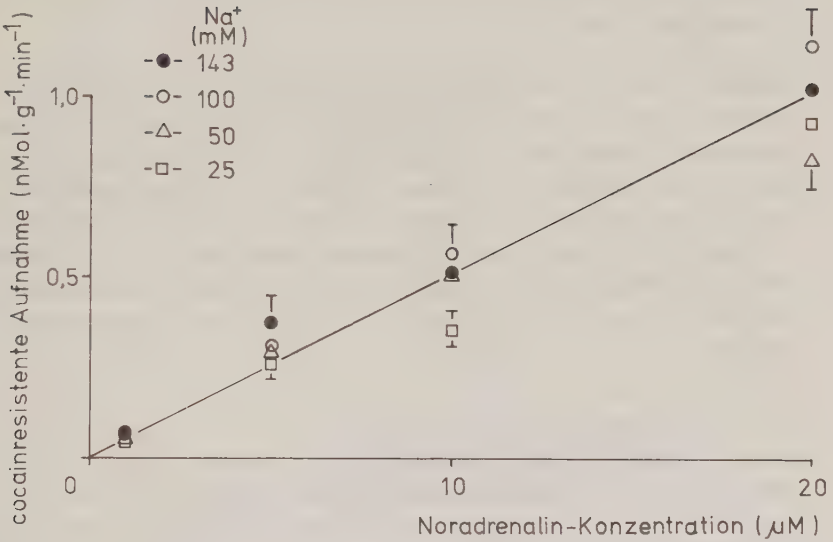


Abb. 5

Verhalten der cocainresistenten Noradrenalin-Aufnahme bei steigenden Noradrenalin- und verschiedenen Na^+-Konzentrationen; Ductus deferens der Ratte.

Ordinate: Cocainresistente Noradrenalin-Aufnahme in $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ (korrigiert mit dem extrazellulär verteilten Amin). Abszisse: Noradrenalin-Konzentration im Inkubationsmedium in µM. Die Gewebe wurden bei steigender ^3H-(-)Noradrenalin-Konzentration (1 bis 20 µM) und verschiedenen Na^+-Konzentrationen (25 bis 143 mM; Na^+-Ersatz durch $Tris^+$) in Gegenwart von 100 µM Cocain und 0,054 mM ^{14}C-Sorbit für 1 min inkubiert. Die übrigen experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Abb. 2 beschrieben. Es handelt sich um die cocainresistente Aufnahme der Versuche von Abb. 9. Dargestellt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus mindestens 6 Versuchen.

sen Versuchen war die Aufnahmerate unabhängig von der Konzentration des zugesetzten NaCl-Ersatzstoffes und betrug im Mittel 0,779 $\pm$ 0,046 ($Cholin^+$) bzw. 0,838 $\pm$ 0,065 $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ ($Tris^+$) (gepaarter t-Test: $P < 0,4$).

Es muß betont werden, daß alle im Abschnitt "Cocainresistente Aufnahme" besprochenen Ergebnisse mit der im Extrazellulärraum verteilten Noradrenalin-Menge korrigiert sind, d.h. die Inkubationslösung enthielt in diesen Versuchen, zur Bestimmung des Extrazellulärraumes, ^{14}C-Sorbit. In 84 Versuchen, in denen die Gewebsproben 1 min inkubiert wurden, machte die im ^{14}C-Sorbitraum verteilte Noradrenalin-Menge im Mittel 70 % der Aufnahme an Noradrenalin aus, die in Gegenwart von 100 µM Cocain beobachtet wurde.

4.2. Neuronale Aufnahme

Bei der weiteren Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit soll nur noch von der neuronalen Noradrenalin-Aufnahme die Rede sein. Wie bereits in der Methodik ausführlich geschildert, ist dies die Differenz zwischen den Aufnahmeraten der beiden Hälften eines Samenleiters, von denen, unter sonst identischen Bedingungen, die eine in Gegenwart und die andere in Abwesenheit von 100 µM Cocain inkubiert worden war.

In einer ersten Gruppe von Versuchen wurde die neuronale Noradrenalin-Aufnahme bei steigender Aminkonzentration (1 bis 20 µM) und verschiedenen Na^+-Konzentrationen (25 bis 143 mM; mit $Cholin^+$ als Na^+-Ersatz) untersucht. Abb. 6 zeigt die gewonnenen Daten einmal in Abhängigkeit von der Noradrenalin-Konzentration (bei verschiedenen Na^+-Konzentrationen; Abb. 6a) und zum anderen in Abhängigkeit von der Na^+-Konzentration (bei verschiedenen Aminkonzentrationen; Abb. 6b). Die Auftragung nach der Methode von Lineweaver und Burk (1934) ergab, daß die Kurven der Abb. 6a der Michaelis-Menten-Kinetik gehorchten, da sie in dieser Dar-

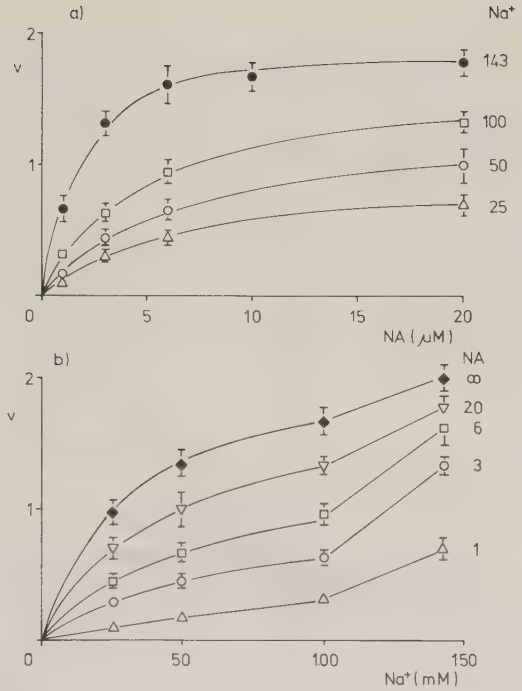


Abb. 6a und b

Neuronale Noradrenalin-Aufnahme als Funktion steigender Konzentrationen von Noradrenalin und Na^+ (Na^+-Ersatz durch $Cholin^+$); Ductus deferens der Ratte.

Ordinaten: v = initiale neuronale Noradrenalin-Aufnahmerate in $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$. Abszissen: a) NA = Konzentration von Noradrenalin im Inkubationsmedium in µM; b) Na^+ = Konzentration von Na^+ im Inkubationsmedium in mM. Die Gewebe wurden mit verschiedenen Konzentrationen von ^3H-(-)Noradrenalin (1 bis 20 µM) und Na^+ (25 bis 143 mM; Na^+-Ersatz durch $Cholin^+$) für 1 min inkubiert. Die experimentellen Bedingungen und die Methode zur Ermittlung der neuronalen Aufnahme sind in der Legende zu Abb. 2 beschrieben. Die Ergebnisse mit dem Symbol "∞" in Abb. 6b entsprechen den V_{max}-Werten (Aufnahmeraten bei unendlich hohen Konzentrationen von Noradrenalin), die aus Abb. 6a für die verschiedenen Na^+-Konzentrationen nach der Methode von Wilkinson (1961) berechnet wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) von mindestens 6 Versuchen.

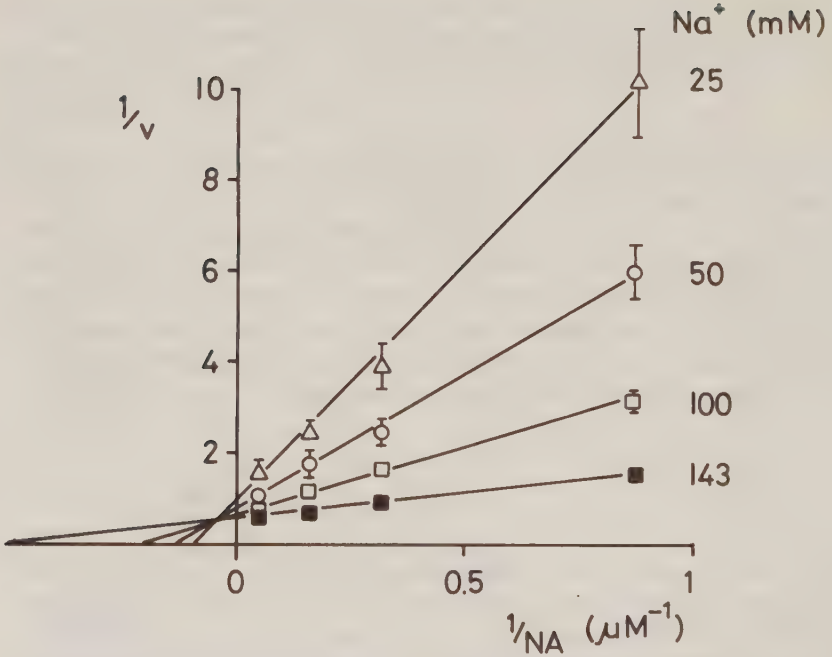


Abb. 7

Lineweaver-Burk-Analyse der neuronalen Noradrenalin-Aufnahme als Funktion der Na^+-Konzentration; Ductus deferens der Ratte. Ordinate: 1/v (v = initiale neuronale Noradrenalin-Aufnahmerate in $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$). Abszisse: 1/NA (NA = Konzentration von ^3H-Noradrenalin im Inkubationsmedium in µM). Zugrunde liegen die Ergebnisse von Abb. 6a. Die Regressionsgeraden wurden mit Hilfe der Methode von Wilkinson (1961) berechnet.

stellung Geraden bildeten (Abb. 7). Als solche gehorchen sie der allgemein für Regressionsgeraden gültigen Formel $y = a + bx$. Dabei entspricht a dem Ordinatenabschnitt zwischen dem Ursprung des Koordinatensystems und dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate ($a = 1/V_{max}$); b ist die Steigung der Geraden ($b = K_m/V_{max}$) (Definition von K_m und V_{max} siehe Methodik). Bei den in den Abbildungen 6a und 7 gezeigten Versuchen änderten sich sowohl a ($1/V_{max}$) als auch b (K_m/V_{max}) mit steigender Na^+-Konzentration. Das bedeutet, daß die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) für Noradrenalin mit steigender Na^+-Konzentration ab-, die V_{max} hingegen Na^+-abhängig zunahm.

Eine Darstellung der in Abb. 6b gezeigten Kurven nach Lineweaver-Burk (1934) war wegen der zwischen 100 und 143 mM Na^+ bestehenden Abknickung des Kurvenverlaufs nicht sinnvoll. Die Ergebnisse von Abb. 6b könnten auf einer, die Wirkung der Na^+-Reduktion übersteigenden, hemmenden Eigenwirkung von $Cholin^+$ beruhen, die auch nach den Ergebnissen von Abb. 2 möglich erscheint. Um diese Möglichkeit näher abzuklären, wurde in einer Versuchsreihe ohne Rücksicht auf die Isotonizität der Inkubationslösung die Na^+-Konzentration im Bereich von 100 bis auf 200 mM gesteigert und im Vergleich dazu, 15 bis 100 mM $Cholin^+$ oder $Tris^+$ zu 100 mM Na^+ hinzugefügt (Abb. 8b). Die gestrichelte Linie in Abb. 8b stellt eine Extrapolation der Kurve von Abb. 8a in den Konzentrationsbereich zwischen 100 und 200 mM dar. Die Versuche von Abb. 8a wurden mit einem Inkubationsmedium durchgeführt, in dem die Osmolarität der einer Lösung mit 100 mM Na^+ entsprach (d.h., die Osmolarität war um 86 mosm/l niedriger, als die einer normalen Krebslösung); bei Na^+-Konzentrationen unter 100 mM wurde das fehlende Na^+ durch $Tris^+$ ersetzt. Aus Abb. 8b geht nun eindeutig hervor, daß steigende Konzentrationen von $Cholin^+$ die Aminaufnahme deutlich stärker beeinträchtigten als steigende Konzentrationen von $Tris^+$ (gepaarte Versuche). Die hemmende Wirkung hoher Na^+- und $Tris^+$-Konzentrationen (im Vergleich zur extrapolierten, gestrichelten Kurve) dürfte auf die Hyperosmola-

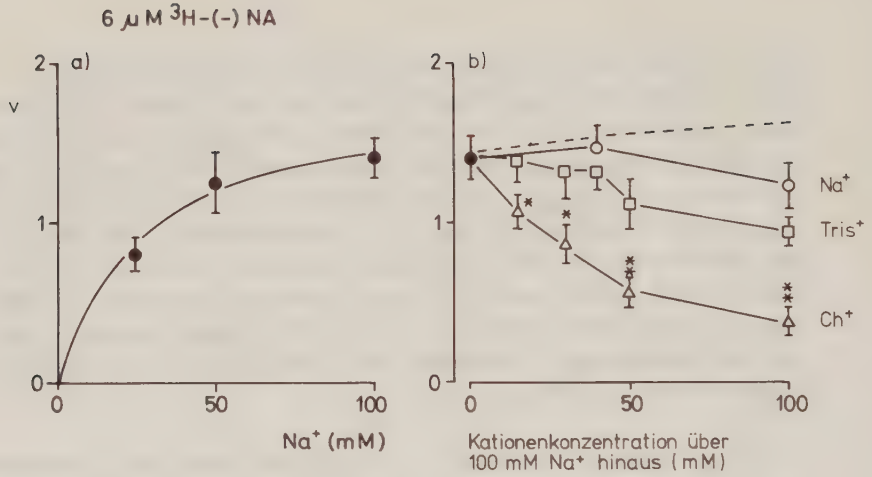


Abb. 8a und b

Einfluß steigender Na^+-, $Tris^+$- und $Cholin^+$-Konzentrationen auf die neuronale Aufnahme von Noradrenalin; Ductus deferens der Ratte. Ordinaten: v = initiale neuronale Noradrenalin-Aufnahmerate in $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$. Abszissen: a) Na^+-Konzentration in mM; b) Konzentration von Na^+, $Tris^+$ oder $Cholin^+$ (Ch^+) in mM, die über 100 mM Na^+ hinaus dem Inkubationsmedium zugesetzt wurde. Die Gewebe wurden mit einer Konzentration von 6,0 µM ^3H-(-)Noradrenalin und steigenden Konzentrationen von Na^+ (25 bis 200 mM), $Tris^+$ oder $Cholin^+$ (15 bis 100 mM) für 1 min inkubiert. Die Osmolarität des Inkubationsmediums der Versuche von Abb. 8a glich der eines Mediums mit 100 mM Na^+ (Na^+-Ersatz durch $Tris^+$); in den Versuchen von Abb. 8b enthielt das Medium darüber hinaus die angegebenen Konzentrationen von Na^+, $Tris^+$ oder $Cholin^+$ (wurde also bei einer Gesamtkonzentration der genannten Kationen über 143 mM hinaus zunehmend hyperton). Die experimentellen Bedingungen und die Methode zur Ermittlung der neuronalen Aufnahme sind in der Legende zu Abb. 2 beschrieben. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus mindestens 6 Versuchen. Die Ergebnisse von Abb. 8b, die den Einfluß steigender Konzentrationen von $Tris^+$ bzw. $Cholin^+$ zeigen, wurden in gepaarten Versuchen (linker bzw. rechter Samenleiter eines Tieres) gewonnen; die Sternchen weisen den signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen aus (t-Test für gepaarte Stichproben; $*P < 0{,}05$; $**P < 0{,}01$). Die gestrichelte Linie in Abb. 8b stellt eine Extrapolation der Ergebnisse von Abb. 8a (Analyse nach Wilkinson, 1961; K_m = 27,8 mM, V_{max} = 1,8 $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) dar.

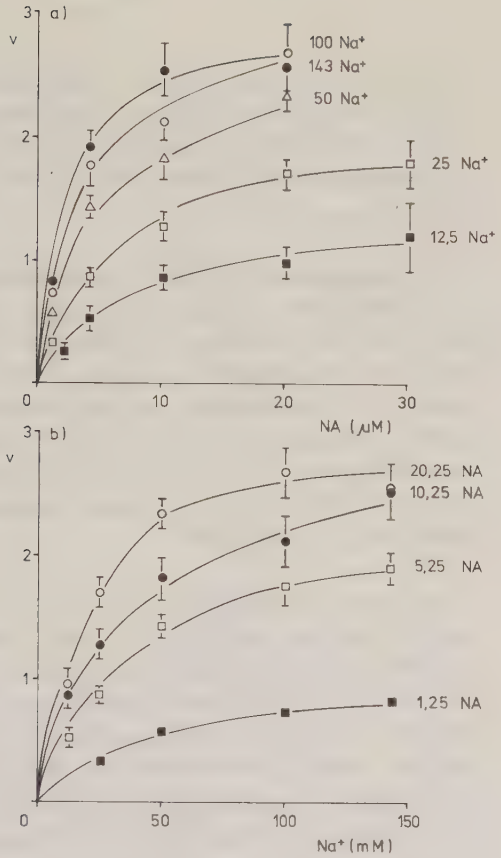


Abb. 9a und b

Sättigungsfähigkeit der neuronalen Noradrenalin-Aufnahme mit steigender Noradrenalin- und Na^+-Konzentration (Na^+-Ersatz durch $Tris^+$); Ductus deferens der Ratte. Ordinaten: v = initiale neuronale Noradrenalin-Aufnahmerate in $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$. Abszissen: a) NA = Noradrenalin-Konzentration im Inkubationsmedium in µM; b) Na^+ = Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium in mM. Die Gewebe wurden mit verschiedenen Konzentrationen von ^3H-(-)Noradrenalin (1,25 bis 30,25 µM) und Na^+ (12,5 bis 143 mM; Na^+-Ersatz durch $Tris^+$) für 1 min inkubiert. Die experimentellen Bedingungen und die Methode zur Bestimmung der neuronalen Aufnahme sind in der Legende zu Abb. 2 beschrieben. Gezeigt sind die Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus mindestens 6 Versuchen.

rität der Lösungen unter den genannten Bedingungen zurückzuführen sein. Cholin$^+$ erwies sich demnach als Hemmstoff der neuronalen Aufnahme. Deshalb erscheinen die aus Abb. 7 gezogenen Schlußfolgerungen, bezüglich der Na^+-abhängigen Änderungen von K_m und V_{max}, fragwürdig.

Aus diesem Grunde wurde in einer weiteren Versuchsserie (ähnlich wie in Abb. 6, aber mit Tris$^+$ statt Cholin$^+$ als Na^+-Ersatz) die neuronale Aufnahme von Noradrenalin erneut untersucht (Abb. 9). Die Ergebnisse zeigen, daß der Noradrenalin-Transport sowohl in Abhängigkeit von der Aminkonzentration (Abb. 9a), als auch in Abhängigkeit von der Na^+-Konzentration (Abb. 9b) sättigungsfähig war. Die in Abb. 6b gezeigte Abknickung des Kurvenverlaufs bei hohen Na^+-Konzentrationen war in diesen Versuchen nicht mehr nachweisbar.

Die doppelt reziproke Darstellung der Ergebnisse (Abb. 10) nach Lineweaver-Burk (1934) ergab (sowohl mit Noradrenalin, als auch mit Na^+ als variablem Substrat) konvergierende Geraden, die alle auf einen gemeinsamen Schnittpunkt links von der Ordinate zuliefen. Das bedeutet, daß die neuronale Aufnahme nicht nur als Funktion der Noradrenalin-Konzentration (Abb. 10a), sondern auch als Funktion der Na^+-Konzentration (Abb. 10b) nach Art der Michaelis-Menten-Kinetik sättigungsfähig war. Qualitativ ähnlich, zumindest für die Noradrenalin-Aufnahme als Funktion der Aminkonzentration, hatte dies schon Abb. 7 gezeigt, wobei Cholin$^+$ als Na^+-Ersatz verwendet worden war.

Die Ergebnisse von Abb. 10 zeigen, daß sich die neuronale Noradrenalin-Aufnahme wie eine Bisubstratreaktion verhält, bei der nicht nur Noradrenalin, sondern auch Na^+ als Substrat des Carriers fungiert. Es war deshalb von Interesse, diese Ergebnisse nach den von Alberty (1953) und Florini und Vestling (1957) angegebenen Richtlinien weiter zu analysieren (Abb. 11). Das Ergebnis dieser Analysen zeigt, daß 1) die Steigungen (K_m/V_{max})

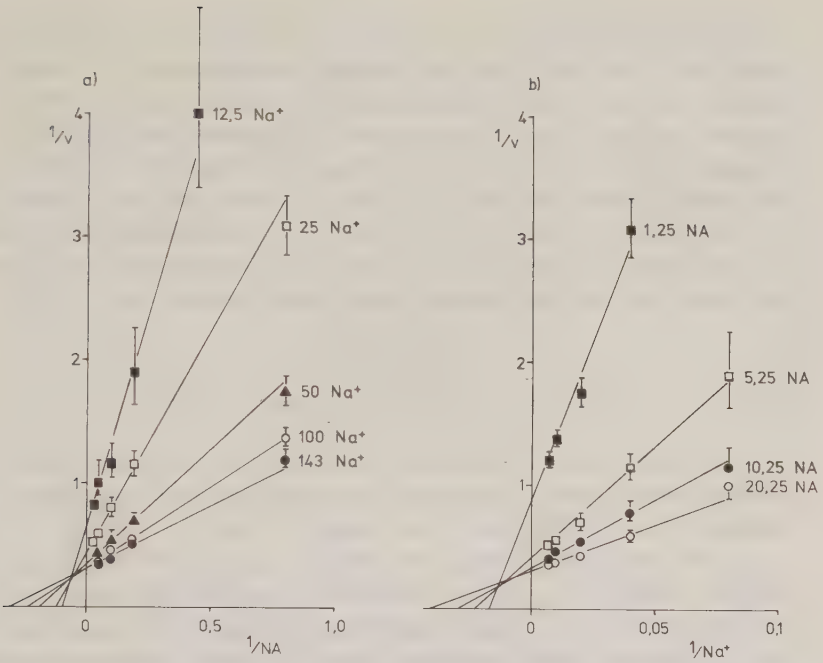


Abb. 10a und b

Lineweaver-Burk-Analyse der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin als Funktion der Noradrenalin- (a) oder Na^+-Konzentration (b); Ductus deferens der Ratte. Ordinaten: 1/v (v = initiale neuronale Noradrenalin-Aufnahmerate in $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$). Abszissen: a) 1/NA (NA = Konzentration von ^3H-(-)Noradrenalin im Inkubationsmedium in µM); b) $1/Na^+$ (Na^+ = Konzentration von Na^+ im Inkubationsmedium in mM). Zugrunde liegen die Ergebnisse von Abb. 9. Die Regressionsgeraden wurden mit Hilfe der Methode von Wilkinson (1961) berechnet. Die Ordinatenabschnitte und die Steigungen dieser Geraden werden in Abb. 11 gezeigt.

und die Ordinatenabschnitte ($1/V_{max}$) der Geraden von Abb. 10a linear mit der reziproken Na^+-Konzentration korreliert waren (Abb. 11a) und 2) die Steigungen und Ordinatenabschnitte der Geraden von Abb. 10b linear mit der reziproken Noradrenalin-Konzentration korreliert waren (Abb. 11b). Aus diesen sekundären Auftragungen ergaben sich gewisse kinetische Konstanten (siehe Legende zu Abb. 11 und Tabelle 1; Nomenklatur nach Alberty, 1953), mit deren Hilfe die neuronale Aufnahme durch folgende Geschwindigkeitsgleichung beschrieben werden kann:

$$v = \frac{V^*_{max} \cdot NA \cdot Na}{K_{NA \cdot Na} + K_{NA} \cdot Na + K_{Na} \cdot NA + NA \cdot Na}$$

(v = initiale Aufnahmegeschwindigkeit; NA und Na^+ = Konzentration von Noradrenalin und Na^+) Die Bedeutung der kinetischen Konstanten der Gleichung geht aus Tabelle 1 hervor. Tabelle 1 zeigt auch, daß die numerische Größe dieser kinetischen Konstanten unabhängig davon war, ob die Ergebnisse der Abb. 10a oder der Abb. 10b für die in Abb. 11 dargestellte Analyse herangezogen wurden. Die sekundären Auftragungen von Abb. 11 haben nicht nur theoretische, sondern durchaus praktische Bedeutung. Wie bereits mehrfach erwähnt, stellt der Ordinatenabschnitt die reziproke V_{max} dar (d.h. die reziproke Aufnahmegeschwindigkeit bei sättigenden Konzentrationen des variablen Substrats), während die Steigung der Lineweaver-Burk-Geraden die reziproke Geschwindigkeitskonstante für den Transport bei sehr niedrigen Konzentrationen des variablen Substrats wiedergibt. Die letztgenannte Feststellung ergibt sich aus der Tatsache, daß sich die Michaelis-Menten-Gleichung $v = V_{max} \cdot S/(K_m+S)$ zu $v = (V_{max}/K_m) \cdot S$ vereinfacht, wenn $S \ll K_m$ angenommen wird. Die Geraden von Abb. 11a (Abb. 11b) zeigen demnach, daß die neuronale ^3H-Noradrenalin-Aufnahme bei sättigenden Aminkonzentrationen (Na^+-Konzentrationen) mit sehr viel niedrigeren Na^+-Konzentrationen (Aminkonzentrationen) gesättigt werden kann, als bei nicht sättigenden, sehr niedrigen Aminkonzentrationen (Na^+-Konzentrationen).

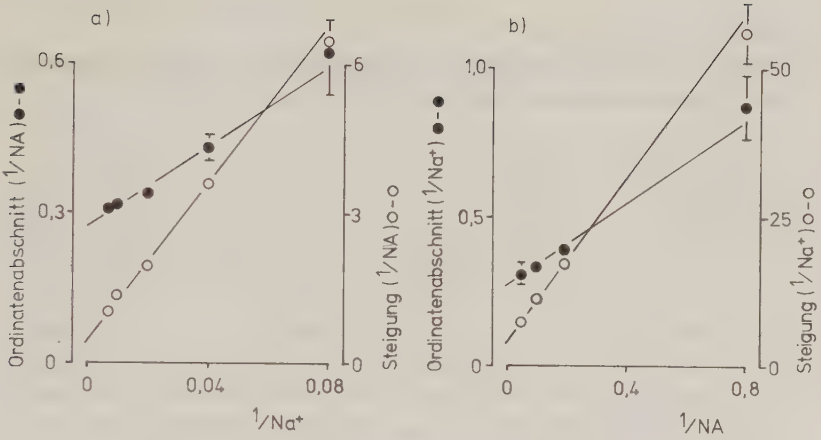


Abb. 11a und b

Analyse der Ergebnisse von Abb. 10.
Ordinaten: a) Ordinatenabschnitte ($1/V_{max}$; V_{max} in $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) und Steigungen (Quotient aus K_m für Noradrenalin und V_{max}; Km in µM) der Geraden von Abb. 10a; b) Ordinatenabschnitte ($1/V_{max}$) und Steigungen (Quotient aus K_m für Na^+ und V_{max}; K_m in mM) der Geraden von Abb. 10b. Abszissen: a) $1/Na^+$ (Na^+ = Konzentration von Na^+ im Inkubationsmedium in mM); b) 1/NA (NA = Noradrenalin-Konzentration im Inkubationsmedium in µM). Die Regressionsgeraden ($y = a + bx$) wurden nach der Methode von Wilkinson (1961) berechnet.

Abb. 11a) ●-●: $a = 1/V^*_{max} = 0{,}279$; $b = K_{Na}/V^*_{max} = 3{,}96$;
o-o: $a = K_{Na}/V^*_{max} = 0{,}473$; $b = K_{NA.Na}/V^*_{max} = 79{,}5$.
Abb. 11b) ●-●: $a = 1/V^*_{max} = 0{,}275$; $b = K_{NA}/V^*_{max} = 0{,}679$;
o-o: $a = K_{Na}/V^*_{max} = 3{,}47$; $b = K_{NA.Na}/V^*_{max} = 74{,}7$.

Die kinetischen Konstanten (V^*_{max}, K_{NA}, K_{Na} und $K_{NA.Na}$), die sich aus diesen Daten ergaben, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt und erklärt.

Tabelle 1

Kinetische Parameter der Na^+-gekoppelten, neuronalen Aufnahme von ^3H-Noradrenalin

Errechnet aus den Geraden von	K_{NA} (µM)	K_{Na} (mM)	$K_{NA \cdot Na}$ (mM^2)	V^*_{max} ($nmol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$)
Abb. 11a	1,7	14	0,28	3,6
Abb. 11b	2,5	13	0,27	3,6

K_{NA} = K_m für Noradrenalin bei sättigenden Na^+-Konzentrationen;

K_{Na} = K_m für Na^+ bei sättigenden Noradrenalin-Konzentrationen;

$K_{NA \cdot Na}$ = Konstante, die die Bisubstratreaktion charakterisiert;

V^*_{max} = maximale initiale Noradrenalin-Aufnahmerate.

D. D I S K U S S I O N

Die vorliegende Arbeit stellt einen Versuch dar, die Wirkung von extrazellulären Na^+-Ionen auf die neuronale Aufnahme von Noradrenalin kinetisch zu analysieren. Die Ergebnisse zeigen, daß die neuronale Aufnahme ein Carriersystem darstellt, in dem Noradrenalin und Na^+ als Substrate fungieren. Diese Schlußfolgerung basiert auf den Regeln, die in der Enzymkinetik üblicherweise angewendet werden, um kinetische Befunde zu interpretieren (Cleland, 1963; Segel, 1975). Es ist klar, daß der direkte Beweis für eine Cosubstrat-Rolle von Na^+ mit den vorliegenden Ergebnissen nicht erbracht werden kann. Mit den gegenwärtigen Methoden erscheint es aber kaum möglich, diesen Beweis zu führen, da die direkte Messung von Na^+-Fluxen durch die axonale Membran sympathischer Nervenendigungen auf bisher unüberwindliche experimentelle Schwierigkeiten stößt.

Die Wirkung von Na^+ auf die Sättigungskinetik der neuronalen Aufnahme ist bereits von mehreren Autoren untersucht worden (z.B. Sugrue und Shore, 1969; Bogdanski et al., 1970; White und Paton, 1972; Sánchez-Armáss und Orrego, 1978). Die in diesen Arbeiten beschriebenen Ergebnisse sind in den wesentlichen Punkten widersprüchlich und können kaum auf einen Nenner gebracht werden. Uneinigkeit herrscht vor allem in der Beantwortung folgender Fragen: Hat die Anwesenheit von Na^+ einen Einfluß auf den K_m oder auf die V_{max} der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin? Welchem Typ der Sättigungskinetik gehorcht die Noradrenalin-Aufnahme als Funktion steigender Na^+-Konzentrationen, und kann das Aufnahmesystem überhaupt mit steigenden Na^+-Konzentrationen gesättigt werden? Ist die Anwesenheit von Na^+ in der extrazellulären Flüssigkeit eine absolute Voraussetzung für die Funktion des Aufnahmesystems? Die zahlreichen Widersprüche in der Literatur, die die Klärung dieser drei Fragenkomplexe betreffen, bringen es mit sich, daß die eigenen Ergebnisse mit einigen der früheren Arbeiten zwar teilweise, mit keiner jedoch voll in

Einklang zu bringen sind. Für diese Diskrepanz gibt es, neben anderen methodischen Details, mindestens drei wichtige Gründe, die im Folgenden zunächst besprochen werden sollen.

1) Die Substanzen, die in früheren Arbeiten verwendet wurden, um das Na^+ (oder NaCl) in Na^+-armen Lösungen zu ersetzen (Saccharose, Li^+ und $Cholin^+$) erwiesen sich später als nicht inert. Die Verwendung von Saccharose ist von vorne herein fragwürdig, da in diesem Fall nicht nur Na^+, sondern auch Cl^- in der Lösung vermindert wird. Dies ist nicht unwesentlich, denn Sánchez-Armáss und Orrego (1977, 1978) haben überzeugend zeigen können, daß die neuronale Aufnahme sowohl von der extrazellulären Na^+- als auch der Cl^--Konzentration abhängt. Was die Ersatzkationen Li^+ und $Cholin^+$ angeht, so hemmen diese, nach Befunden von Keller und Graefe (1979), die neuronale Aufnahme im Vergleich zu $Tris^+$ als Ersatzkation. In dieser Arbeit wurden mehrere monovalente Kationen getestet und nachgewiesen, daß die aufnahmestimulierende Wirkung von Na^+ in Gegenwart von $Tris^+$ als Na^+-Ersatz am stärksten war, und, nur in diesem Fall, sich die Noradrenalin-Aufnahme als Funktion der Na^+-Konzentration mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben ließ (d.h., einer "einfachen" Sättigungskinetik gehorchte). Die eigenen Ergebnisse bestätigen diese Beobachtungen. So zeigt z.B. Abb. 2, daß die neuronale Aufnahme von ^3H-Noradrenalin bei niedrigen Na^+-Konzentrationen am höchsten war, wenn $Tris^+$ als Ersatz für Na^+ verwendet wurde, und aus Abb. 8 geht eindeutig hervor, daß $Cholin^+$ im Vergleich zu $Tris^+$ die neuronale Aufnahme konzentrationsabhängig hemmte. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den hier vorgestellten Versuchen und den früheren Arbeiten anderer Autoren besteht also in der Tatsache, daß hier das "inerte" Ersatzkation $Tris^+$ (Keller und Graefe, 1979) verwendet wurde, während dort Ersatzstoffe mit inhibitorischen Eigenwirkungen (d.h. hemmenden Wirkungen, die über den Einfluß einer Verminderung der Na^+-Konzentration hinausgehen) eingesetzt wurden. So zeigt z.B. die zitierte Arbeit von Sánchez-Armáss und Orrego

(1978) in Abb. 4 einen ähnlichen Befund wie Abb. 6 der vorliegenden Arbeit, was von den Autoren jedoch nicht als Hemmwirkung des verwendeten Cholin$^+$, sondern dahingehend interpretiert wird, daß der Noradrenalin-Carrier zwei Bindungsstellen für Na^+ besitzt.

2) In den meisten der früheren Arbeiten wurden Gewebe verwendet, in denen die endogenen Noradrenalinspeicher nicht entleert waren. In den eigenen Untersuchungen wurden die Tiere mit Reserpin vorbehandelt, um den Gewebsgehalt an Noradrenalin drastisch zu vermindern. Versuche von Keller und Graefe (1979) haben gezeigt, daß die Vorbehandlung mit Reserpin (wie sie auch hier durchgeführt wurde) zu einer Abnahme des Noradrenalingehalts im Ductus deferens der Ratte auf 0,7 % der Kontrolle führt. Die Entleerung der endogenen Noradrenalinspeicher ist wichtig, denn Inkubationslösungen mit niedrigen Na^+-Konzentrationen bewirken eine Freisetzung endogenen Noradrenalins in das Medium (Garcia und Kirpekar, 1973), das in großen Mengen dann eine genaue Messung der Aufnahme des exogenen Amins beeinträchtigen kann (entweder durch Hemmung der Aufnahme oder durch Verdünnung der spezifischen Aktivität des zugesetzten, radioaktiv markierten Amins). Die Möglichkeit der Verzerrung von Ergebnissen bei Verwendung nicht mit Reserpin vorbehandelter Gewebe ist auch durch Versuche von Sánchez-Armáss und Orrego (1978) aufgezeigt worden. Diese Autoren haben nachgewiesen, daß aus einer hyperbolen Beziehung zwischen der Noradrenalin-Aufnahmerate und der Na^+-Konzentration (Sättigung der Aufnahme mit steigender Na^+-Konzentration) eine lineare Beziehung wird (keine Sättigung der Aufnahme mit steigender Na^+-Konzentration), wenn die Versuche nicht mit Gewebsproben von mit Reserpin vorbehandelten, sondern von unbehandelten Tieren durchgeführt werden.

3) In vielen früheren Arbeiten wurde die Aufnahme von Noradrenalin nicht mit der unspezifischen Aufnahme in "nicht-neuronale" Gewebselemente korrigiert. Das hatte zur Folge, daß in einigen

Beobachtungen ein Teil der Aminaufnahme Na^+-unabhängig war (siehe z.B. Horst et al., 1968; White und Paton, 1972). In der vorliegenden Arbeit wurde nur der durch hohe Konzentrationen von Cocain (100 µM) zu beseitigende Anteil der Noradrenalin-Aufnahme als "neuronal" angesehen, und alle kinetischen Analysen basieren auf dieser neuronalen Aufnahmekomponente. Versuche, bei denen der Extrazellulärraum mittels ^{14}C-Sorbit bestimmt wurde, haben gezeigt, daß die in Gegenwart von Cocain beobachtete "Aufnahme" zu etwa 70 % auf extrazellulär verteiltes ^3H-Noradrenalin zurückging. Der Rest, die sogenannte "cocainresistente Aufnahme", war weder Na^+-abhängig, noch durch steigende Noradrenalin-Konzentrationen zu sättigen (siehe Abbildungen 4 und 5). Es ist interessant festzuhalten, daß die cocainresistente Aufnahme im Ductus deferens der Ratte offensichtlich nichts mit der von Iversen (1965) beschriebenen extraneuronalen Aufnahme ($uptake_2$) zu tun hat, denn hohe Konzentrationen von Corticosteron (einem selektiven Hemmstoff von $uptake_2$; Iversen und Salt, 1970) hatten keinen Einfluß auf diese Aufnahme (siehe Abb. 1). Außerdem hatte Oxytetracyclin (ein Hemmstoff der Bindung von Katecholaminen an Kollagen und Elastin; Powis,1973) keinen nachweisbaren Effekt. Es wäre deshalb durchaus möglich, daß die Aufnahme von ^3H-Noradrenalin, die in Gegenwart von Cocain beobachtet wurde (und zwar der Anteil, der nach Subtraktion des Extrazellulärraumes übrigblieb), die Diffusion des Amins in das Gewebe widerspiegelt.

Es ist allgemein akzeptiert, daß die Kinetik von carriervermittelten Transportprozessen den gleichen Gesetzmäßigkeiten gehorcht wie die Kinetik von enzymkatalysierten Reaktionen (Christensen, 1975). Um die Interaktionen zwischen Noradrenalin und Na^+ bei der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin diskutieren zu können, müssen deshalb (wie zu Beginn der Diskussion und in den Ergebnissen bereits angedeutet) gewisse Regeln der Enzymkinetik besprochen werden. Enzymatische Reaktionen, bei denen zwei Substrate involviert sind, können im Allgemeinen ent-

weder als sequentielle oder als nicht-sequentielle Mechanismen ablaufen (Segel, 1975). Sequentielle Mechanismen sind dadurch charakterisiert, daß der Umsatz der Substrate (und damit die Produktbildung) nur über die Bildung eines ternären Komplexes möglich ist, d.h. beide Substrate müssen erst an das Enzym binden, ehe die Produkte abgegeben werden. Im Gegensatz dazu wird bei nicht-sequentiellen Reaktionen immer nur ein Substrat an das Enzym gebunden, das danach zunächst das erste Produkt abgibt, um erst dann das zweite Substrat zu binden und umzusetzen (Ping-Pong-Mechanismus nach Cleland, 1963). Für nicht-sequentielle Mechanismen ergibt sich eine Schar von parallelen Geraden, wenn man die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion bei verschiedenen Konzentrationen des einen Substrats in Gegenwart einer Reihe von konstanten Konzentrationen des anderen Substrats bestimmt und nach Lineweaver-Burk (1934) aufträgt. Bei bestimmten Fällen von sequentiellen Reaktionen dagegen zeigt das Lineweaver-Burk-Diagramm nicht parallele, sondern konvergierende Geraden, die sich links von der Ordinate schneiden. Abb. 10 zeigt deutlich, daß sich ein solches Bild für die neuronale Aufnahme ergab, und zwar nicht nur für Noradrenalin, sondern auch für Na^+ als variables Substrat. Die kinetischen Eigenschaften der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin sind demnach vergleichbar mit denen einer sequentiellen Bisubstratreaktion, d.h. die Kinetik deutet darauf hin, daß Na^+ in einer sequentiellen Reaktion als Cosubstrat des Noradrenalin fungiert. Die Ergebnisse von Abb. 10 lassen sich außerdem dahingehend interpretieren, daß Noradrenalin und Na^+ gegenseitig kooperativ waren, denn steigende Konzentrationen des einen Substrats erhöhten nicht nur die Reaktivität (reziproker K_m) des anderen Substrats, sondern auch die V_{max} des Transports. Ähnliche Ergebnisse (wie die in Abb. 10 vorgestellten) wurden auch für andere Na^+-abhängige Transportsysteme beschrieben, in denen der Cotransport von Na^+ außer Frage steht (Wheeler et al., 1965; Inui und Christensen, 1966; Thomas und Christensen, 1971; Heinz und Geck, 1978).

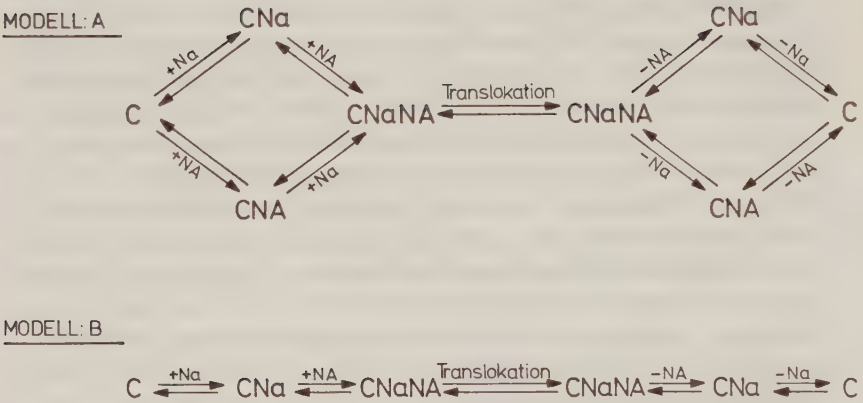


Abb. 12

Schematische Darstellung der beiden Typen von sequentiellen Bisubstratreaktionen, mittels derer der Cotransport von Noradrenalin (NA) und Na^+ durch den neuronalen Aufnahme-Carrier (C) modellhaft veranschaulicht werden kann. Modell A: Zufallsmechanismus; Modell B: geordneter Mechanismus. Weitere Details sind im Text ausführlich dargestellt.

Von den verschiedenen Typen sequentieller Bisubstratreaktionen (zur Diskussion dieser Frage siehe Cleland, 1963, und Segel, 1975) sind eigentlich nur zwei mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vereinbar, nämlich der Zufallsmechanismus und der geordnete Mechanismus. Die Reaktionssequenzen dieser beiden Mechanismen sind in Abb. 12 als Modell A (Zufallsmechanismus) und Modell B (geordneter Mechanismus) dargestellt. Zu der Aussage, daß die neuronale Aufnahme mit diesen beiden Modellen beschrieben werden kann, berechtigt vor allem die Analyse der Abb. 11 und die Beobachtung, daß die kinetischen Konstanten, die sich aus den beiden Hälften dieser Abbildung ergaben, praktisch identisch waren (siehe Tabelle 1). Modell A ist dadurch charakterisiert, daß die Reihenfolge, mit der der Carrier (C) die Substrate bindet, dem Zufall überlassen bleibt, so daß die Bildung des ternären Komplexes (CNaNA) über die Bildung von zwei binären Komplexen (CNa oder CNA) möglich ist. Dieses Modell wäre mit den experimentellen Befunden nur dann vereinbar, wenn die Translokation von CNaNA geschwindigkeitsbestimmend ist, d.h. die Einstellung des Äquilibriums zwischen dem ternären Komplex und den binären Komplexen sehr schnell vonstatten geht (Annahme eines schnellen Gleichgewichts; Michaelis und Menten, 1913). In Modell B erfolgt die Bindung der beiden Substrate an den Carrier in einer obligatorischen Reihenfolge und führt über die Bildung von nur einem binären Komplex (CNa) zur Entstehung des ternären Komplexes. Prinzipiell wäre in Modell B auch Noradrenalin als führendes Substrat denkbar (d.h., die Bildung des binären Komplexes CNA). Diese Möglichkeit ist jedoch aus Gründen, die noch zu diskutieren sein werden in Abb. 12 nicht aufgeführt. Modell B wäre mit den experimentellen Beobachtungen nur dann vereinbar, wenn die Translokation von CNaNA nicht geschwindigkeitsbestimmend ist, d.h. wenn ein Fließgleichgewicht zwischen den einzelnen Carrierformen (C, CNa und CNaNA) und den Substraten angenommen wird ("steady-state"-Kinetik nach Briggs und Haldane, 1925).

Keines der beiden Modelle beinhaltet die Möglichkeit, daß die binären Komplexe CNa und CNA transportiert werden. Vielmehr legen die Ergebnisse von Abb. 10 und 11 die Annahme nahe, daß nur der ternäre Komplex zur Translokation befähigt ist. Es gibt einige Befunde aus der Literatur, die diese Arbeitshypothese stützen. Die lineare Abhängigkeit der reziproken Aufnahmegeschwindigkeit von der reziproken Na^+-Konzentration (Horst et al., 1968; Bogdanski et al., 1970; Keller und Graefe, 1979) und die Beobachtung, daß in vielen Geweben die Anwesenheit extrazellulärer Na^+-Ionen eine absolute Voraussetzung für den Nachweis der neuronalen Aufnahme darstellt (Iversen und Kravitz, 1966; Sugrue und Shore, 1969; Sánchez-Armáss und Orrego, 1978; Keller und Graefe, 1979), machen es sehr schwer, die Möglichkeit zu akzeptieren, daß die Translokation des CNA-Komplexes zu einem wesentlichen Teil zur neuronalen Aufnahme von Noradrenalin beitragen soll. Was den CNa-Komplex angeht, kann die Annahme, daß dieser Komplex ebenfalls unbeweglich ist, zum gegenwärtigen Zeitpunkt durch einen direkten Beweis experimentell weder gestützt noch widerlegt werden. Es gibt aber experimentelle Befunde, die so interpretiert werden können. Es ist z.B. von verschiedenen Autoren gezeigt worden, daß in Abwesenheit von extrazellulärem Amin der neuronale Efflux von axoplasmatischem ^3H-Noradrenalin konzentrationsabhängig durch externes Na^+ gehemmt wird (Bogdanski et al., 1968; Paton, 1973; Graefe und Fuchs, 1979). Außerdem hemmen Maßnahmen, die die intrazelluläre Na^+-Konzentration steigern (z.B. Inkubation der Gewebe mit g-Strophantin oder K^+-freien Lösungen), die neuronale Aufnahme von ^3H-Noradrenalin (Dengler et al., 1962; Green und Miller, 1966; Gillis und Paton, 1967; Colburn et al., 1968). Da die inhibitorischen Wirkungen von Na^+ auf den neuronalen Influx und Efflux von ^3H-Noradrenalin unter den geschilderten experimentellen Bedingungen jeweils auf die Seite der axonalen Membran beschränkt sind, zu der der Aminflux gerichtet ist, kann man diese Effekte als transinhibitorische Effekte bezeichnen (Schulz und Curran, 1970; Christensen, 1975). Wenn man diese Interpretation akzep-

tiert, ergibt sich zwangsläufig, daß der mit Na^+ beladene Carrier nicht beweglich ist. Der CNa-Komplex wäre demnach ein "inaktiver Zustand" des Carriers, der (in Abwesenheit von Amin-Substrat) jeweils auf der Seite der Membran festgehalten werden würde, auf der die Na^+-Konzentration hoch ist. Der unbeladene Carrier müßte also frei beweglich sein, um sich nach den vorherrschenden Na^+-Konzentrationen in der Membran verteilen zu können, d.h. beide Modelle müßten dahingehend erweitert werden, daß der freie Carrier sich ungehindert zwischen den beiden Seiten der Membran bewegen kann. Diese Schlußfolgerung kann bereits als experimentell bestätigt angesehen werden. An perfundierten Herzen von mit Reserpin vorbehandelten Kaninchen, Katzen und Ratten wurde nämlich gezeigt, daß während der Perfusion mit einer konstanten Noradrenalin-Konzentration und bei ungehemmter Monoaminoxidase die intraneuronale Amin-Desaminierung nach einer Übergangsphase von einigen Minuten über lange Zeit mit konstanter Geschwindigkeit abläuft (Graefe et al., 1975; Fiebig und Trendelenburg, 1978). Eine solche Beobachtung ist nur möglich, wenn der freie, unbeladene Carrier zu rezirkulieren vermag.

Obwohl beide Modelle von Abb. 12 mit den Ergebnissen vereinbar wären, wird Modell B als das realistischere angesehen. Der Grund für diese Annahme liegt darin, daß auch sehr hohe Aminkonzentrationen (in Abwesenheit von Na^+) keine transinhibitorischen Effekte auf den neuronalen Efflux von ^3H-Noradrenalin zeigen (Fuchs und Graefe, persönliche Mitteilung). Solche Effekte sollte man aber erwarten, wenn Aminsubstrate auch in Abwesenheit von Na^+ an den Carrier gebunden werden, denn der CNA-Komplex wird, gemäß Modell A, nicht transportiert. Es ist deshalb berechtigt, anzunehmen, daß, entsprechend Modell B, Aminsubstrate nicht an den freien Carrier gebunden werden, sondern nur an den CNa-Komplex. Aus dem gleichen Grunde ist Noradrenalin als führendes Substrat in Modell B unwahrscheinlich, d.h. die oben erwähnte, prinzipiell mögliche Bildung von CNA zu vernach-

lässigen. Unabhängig davon, welches der beiden Modelle die neuronale Aminaufnahme besser beschreibt, sind beide in der Lage, eine Netto-Aufnahme von Amin zu bewerkstelligen und Konzentrationsgradienten zu schaffen, wie bereits von Iversen (1963) gezeigt wurde. Außerdem sind in beiden Modellen die initiale Aufnahmerate und der Konzentrationsgradient im Fließgleichgewicht, entsprechend der Na^+-Gradienten-Hypothese von Crane (1965), vom Na^+-Gradienten abhängig.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1) Ductus deferentes von mit Reserpin vorbehandelten Ratten wurden (bei Hemmung beider metabolisierender Enzyme) mit verschiedenen Konzentrationen von ^{3}H-(-)Noradrenalin (1,25 bis 30,25 µM) und Na^+ (0 bis 143 mM; Na^+-Ersatz durch $Tris^+$, aber zum Vergleich auch $Cholin^+$, Li^+ und Saccharose) inkubiert, wobei die neuronale Aufnahme in jedem einzelnen Samenleiter aus der Differenz zwischen der Aufnahme in Ab- und der in Anwesenheit von 100 µM Cocain berechnet wurde.

2) Da die neuronale Aufnahme bis zur 2. min linear verlief, wurde zur Messung initialer Aufnahmeraten die Inkubationsdauer von 1 min gewählt.

3) Die Noradrenalin-Aufnahme in Gegenwart von Cocain war nicht durch Corticosteron hemmbar, dürfte also nicht auf $uptake_2$ (Iversen, 1965) zurückzuführen sein.

4) Die cocainresistente Aufnahme (unabhängig von der Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium) und die Aufnahme in Na^+-freiem Medium waren gleich groß und im untersuchten Konzentrationsbereich von Noradrenalin nicht sättigungsfähig.

5) Die in der Literatur bisher u.a. als Na^+-Ersatz verwendeten Ionen $Cholin^+$ und Li^+ zeigten eine hemmende Eigenwirkung, die über die Wirkung der Na^+-Reduktion hinausging, was bei $Tris^+$ nicht der Fall war.

6) Mit $Tris^+$ als Na^+-Ersatz war die neuronale Noradrenalin-Aufnahme sowohl in Abhängigkeit von der Noradrenalin-Konzentration, als auch von der Na^+-Konzentration nach Art der Michaelis-Menten-Kinetik sättigungsfähig.

7) Die Darstellung dieser Ergebnisse nach der Methode von Lineweaver-Burk (1934) ergab in beiden Fällen konvergierende Geraden mit einem Schnittpunkt links der Ordinate.

8) Dies deutet darauf hin, daß Na^+ in einer sequentiellen Bisubstratreaktion als Cosubstrat des Noradrenalin bei dessen neuronaler Aufnahme fungiert.

9) Da steigende Konzentrationen des einen Substrats nicht nur die Reaktivität des anderen (reziproker K_m), sondern auch die V_{max} des Transports erhöhen, dürften Noradrenalin und Na^+ gegenseitig kooperativ sein.

10) Von den verschiedenen Typen sequentieller Bisubstratreaktionen dürfte am ehesten der "geordnete Mechanismus" (steady-state ordered mechanism; Segel, 1975) mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und der Literatur in Einklang zu bringen sein, bei dem der Carrier (C) erst mit Na^+ den binären Komplex CNa bildet und nach Bindung von Noradrenalin (NA) als CNaNA transportiert wird. Diese Vorstellung ist mit früheren Ergebnissen nur dann vereinbar, wenn die zusätzliche Annahme gemacht wird, daß der unbeladene Carrier frei beweglich ist.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ALBERTY, R. A.:
The relationship between Michaelis constants, maximum velocities and the equilibrium constant for an enzyme-catalysed reaction.
J. Am. Chem. Soc. 75, 1928-1932 (1953)

2. BERTI, F., SHORE P. A.:
A kinetic analysis of drugs that inhibit the adrenergic neuronal amine pump.
Biochem. Pharmacol. 16, 2091-2094 (1967)

3. BOGDANSKI, D. F., BRODIE, B. B.:
Role of sodium and potassium ions in storage of norepinephrine by sympathetic nerve endings.
Life Sci. 5, 1563-1569 (1966)

4. BOGDANSKI, D. F., TISSARI, A., BRODIE, B. B.:
Role of sodium, potassium, ouabain and reserpine in uptake, storage and metabolism of biogenic amines in synaptosomes.
Life Sci. 7, 419-428 (1968)

5. BOGDANSKI, D. F., TISSARI, A. H., BRODIE, B. B.:
Mechanism of transport and storage of biogenic amines. III. Effects of sodium and potassium on kinetics of 5-hydroxytryptamine and norepinephrine transport by rabbit synaptosomes.
Biochim. Biophys. Acta, 219, 189-199 (1970)

6. BRIGGS, G. E., HALDANE, J. B. S.:
A note on the kinetics of enzyme action.
Biochem. J. 19, 338-339 (1925)

7. BURN, H. J.:
The action of tyramine and ephedrine.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 46, 75-95 (1932)

8. CHRISTENSEN, H. N.:
Biological Transport (2nd ed.)
London-Amsterdam- Don Mills,
Ontario-Sydney-Tokyo: W. A. Benjamin (1975)

9. CLELAND, W. W.:
The kinetics of enzyme-catalysed reactions with two or more substrates or products.
I. Nomenclature and rate equations.
Biochim. Biophys. Acta 67, 104-137 (1963)

10. COLBURN, R. W., GOODWIN, F. K., MURPHY, D. L., BUNNEY, W. E., DAVIS, J. M.:
Quantitative studies of norepinephrine uptake by synaptosomes.
Biochem. Pharmacol. 17, 957-964 (1968)

11. CRANE, R. K.:
Na^+-dependent transport in the intestine and other animal tissues.
Fed. Proc. 24, 1000-1006 (1965)

12. DENGLER, H. J., MICHAELSON, I. A., SPIEGEL, H. E., TITUS, E.:
The uptake of labelled norepinephrine by isolated brain and other tissues of the cat.
Int. J. Neuropharmacol. 1, 23-28 (1962)

13. FARNEBO, L. O., MALMFORS, T.:
Histochemical studies on the uptake of noradrenaline and α-methylnoradrenaline in the perfused rat heart.
Europ. J. Pharmacol. 5, 313-320 (1969)

14. FIEBIG, E. R., TRENDELENBURG, U.:
The neuronal and extraneuronal uptake and metabolism of ^3H-(-)-noradrenaline in the perfused rat heart.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 303, 21-35 (1978)

15. FISCHER, J. E., KOPIN, I. J., AXELROD, J.:
Evidence for extraneuronal binding of norepinephrine.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 147, 181-185 (1965)

16. FLORINI, J. R., VESTLING, C. S.:
Graphical determination of the dissociation constants for two-substrate enzyme systems.
Biochim. Biophys. Acta 25, 575-578 (1957)

17. GARCIA, A. G., KIRPEKAR, S. M.:
Release of noradrenaline from the cat spleen by sodium deprivation.
Brit. J. Pharmacol. 47, 729-747 (1973)

18. GILES, R. E., MILLER, J. W.:
A comparison of certain properties of catechol-O-methyl transferase to those of adrenergic beta-receptors.
J. Pharmac. Exp. Ther. 156, 201-206 (1967)

19. GILLESPIE, J. S., MUIR, T. C.:
Species and tissue variation in extraneuronal and neuronal accumulation of noradrenaline.
J. Physiol. 206, 591-604 (1970)

20. GILLIS, C. N., PATON, D. M.:
Cation dependence of sympathetic transmitter retention by slices of rat ventricle.
Brit. J. Pharmacol. 29, 309-318 (1967)

21. GRAEFE, K.-H., ECKERT, E.:
On the stereoselectivity of the neuronal uptake in the cat's nictitating membrane.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 286, 45-68 (1972)

22. GRAEFE, K.-H., STEFANO, F. J. E., LANGER, S. Z.:
Preferential metabolism of (-)-^{3}H-norepinephrine through the deaminated glycol in the rat vas deferens.
Biochem. Pharmacol. 22, 1147-1160 (1973)

23. GRAEFE, K.-H, BÖNISCH, H., FIEBIG, R., TRENDELENBURG, U.:
Extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines in isolated perfused hearts.

In: Proceedings of the 6th Internat. Congress of Pharmacol.
(J. Tuomisto and M. K. Paasonen, Herausgeber),
Band 2 (Neurotransmission), Seiten 117-130, Helsinki (1975)

24. GRAEFE, K.-H.:
Methodology of catecholamine transport studies: definition of terms.
In: The Mechanisms of Neuronal and Extraneuronal Transport of Catecholamines
(D. M. Paton, Herausgeber), Seiten 7-35,
New York: Raven Press 1976

25. GRAEFE, K.-H., BÖNISCH, H., KELLER, B.:
Saturation kinetics of the adrenergic neurone uptake system in the perfused rabbit heart. A new method for determination of initial rates of amine uptake.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, 263-273 (1978)

26. GRAEFE, K.-H., FUCHS, G.:
On the mechanism of neuronal efflux of axoplasmic ^{3}H-(-)-noradrenaline.
In: Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers
(E. Usdin, I. J. Kopin, J. Barchas; eds.),
volume 1, pp. 268-270, New York-Oxford-Toronto-Sidney-Frankfurt-Paris: Pergamon Press 1979

27. GRAEFE, K.-H., KELLER, B., SAMMET, S.:
The role played by external sodium (Na^{+}) in the neuronal uptake of noradrenaline (NA).
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308, Suppl. R 2 (1979)

28. GREEN R. D., MILLER, J. W.:
Evidence for the active transport of epinephrine and norepinephrine by the uterus of the rat.
J. Pharmacol. exp. Ther. 152, 42-50 (1966)

29. HAMBERGER, B., MALMFORS, T., NORBERG, K. A., SACHS, C.:
Uptake and accumulation of catecholamines in peripheral adrenergic neurons of reserpinized animals, studied with a histochemical method.
Biochem. Parmacol. 13, 841-844 (1964)

30. HEINZ, E., GECK, P.:
The electrical potential difference as a driving force in Na^+-linked cotransport of organic solutes.
In: Membrane Tranport Processes, Band 1 (J. F. Hoffman), Seiten 13-30, New York: Raven Press (1978)

31. HORST, W. D., KOPIN, I. J., RAMEY, E. R.:
Influence of sodium and calcium on norepinephrine uptake by isolated perfused rat hearts.
Am. J. Physiol. 215, 817-822 (1968)

32. INUI, Y., CHRISTENSEN, H. N.:
Discrimination of single transport systems. The Na^+-sensitive transport of neutral amino acids in the Ehrlich cell.
J. Gen. Physiol. 50, 203-224 (1966)

33. IVERSEN, L. L.:
The uptake of noradrenaline by the isolated perfused rat heart.
Brit. J. Pharmacol. 21, 523-537 (1963)

34. IVERSEN, L. L.:
The uptake of catecholamines at high perfusion concentrations in the isolated rat heart: A novel catecholamine uptake process.
Brit. J. Pharmacol. 25, 18-33 (1965)

35. IVERSEN, L. L. KRAVITZ, E. A.:
Sodium dependence of transmitter uptake at adrenergic nerve terminals.
Mol. Pharmacol. 2, 360-262 (1966)

36. IVERSEN, L. L.:
The Uptake and Storage of Noradrenaline in Sympathetic Nerves.
London: Cambridge University Press 1967

37. IVERSEN, L. L., SALT, P. J.:
Inhibition of catecholamine uptake by steroids in the isolated rat heart.
Brit. J. Pharmacol. 40, 528-530 (1970)

38. IVERSEN, L. L.:
Uptake processes for biogenic amines
In: Handbook of Psychopharmacology
(L. L. Iversen, Herausgeber),
New York-London: Plenum Press 1975

39. JARROT, B.:
Uptake and metabolism of catecholamines in the perfused hearts of different species.
Brit. J. Pharmacol. 38, 810-821 (1970)

40. KELLER, B., GRAEFE, K.-H.:
The inhibitory effect of some monovalent cations on the stimulation by Na^+ of the neuronal uptake of noradrenaline.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. (im Druck)

41. LINEWEAVER, W., BURK, D.:
The determination of enzyme dissociation constants.
J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666 (1934)

42. MICHAELIS, L., MENTEN, M. L.:
Die Kinetik der Invertinwirkung.
Biochem. Z. 49, 333-369 (1913)

43. MORGAN, H. E.,HENDERSON, M. J., REGEN, D. M., PARK, C. R.:
Regulation of glucose uptake in muscle.
I. The effects of insulin and anoxia on glucose transport and phosphorylation in the isolated, perfused heart of normal rats.
J. Biol. Chem. 236, 253-261 (1961)

44. MUSCHOLL, E.:
Effect of cocain and related drugs on the uptake of noradrenaline by heart and spleen.
Brit. J. Pharmacol. 16, 352-359 (1961)

45. PATON, D. M.:
Mechanism of efflux of noradrenaline from adrenergic nerves in rabbit atria.
Brit. J. Pharmacol. 49, 614-627 (1973)

46. POWIS, G.:
Binding of catecholamines to connective tissue and the effect upon the responses of blood vessels to noradrenaline and to nerve stimulation.
J. Physiol. (London) 234, 145-162 (1973)

47. SAMMET, S., GRAEFE, K.-H.:
Kinetic analysis of the interaction between noradrenaline and Na^+ in neuronal uptake:
Kinetic evidence for co-transport.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. (im Druck)

48. SÁNCHEZ-ARMÁSS, S., ORREGO, F.:
A major role for chloride in (^{3}H)-noradrenaline transport by rat heart adrenergic nerves.
Life Sci. 20, 1829-1838 (1977)

49. SÁNCHEZ-ARMÁSS, S., ORREGO, F.:
Noradrenaline transport by rat heart sympathetic nerves: a re-examination of the role of sodium ions.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, 255-261 (1978)

50. SCHULTZ, S. G., CURRAN, P. F.:
Coupled transport of sodium and organic solutes.
Physiol. Revs. 50, 637-718 (1970)

51. SEGEL, I. H.:
Enzyme Kinetics. Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems.
New York-London-Sydney-Toronto: John Wiley & Sons 1975

52. SNEDECOR, G. W., COCHRAN, W. G.:
Statistical Methods (6. Auflage)
Ames: Iowa State University Press 1967

53. STRÖMBLAD, B. C. R., NICKERSON, M.:
Accumulation of epinephrine and norepinephrine by some rat tissues.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 108, 345-347 (1961)

54. SUGRUE, M. F., SHORE, P. S.:
The mode of sodium dependency of the adrenergic neuron amine carrier. Evidence for a second, sodium dependent, optically specific and reserpine sensitive system.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 170, 239-245 (1969)

55. THOENEN, H., HÜRLIMANN, A., HAFFELY, W.:
The effect of sympathetic nerve stimulation on volume, vascular resistance and norepinephrine output in the isolated perfused spleen of cat an its modification by cocaine.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 143, 57-63 (1964a)

56. THOENEN, H., HÜRLIMANN, A., HAFFELY, W.:
Mode of action of imipramin and 5-(3-methylaminopropyliden)-dibenzo-Ia, eI-cycloheptI1,3,5Itrien hydrochloride (Ro4-6011), a new antidepressant drug, on peripheral adrenergic mechanisms.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 144, 405-414 (1964b)

57. THOENEN, H., TRANZER, J. P.:
Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine.
Arch. Pharmac. Exp. Pathol. 261, 271-288 (1968)

58. THOMAS, E. L., CHRISTENSEN, H. N.:
Nature of the cosubstrate action of Na^+ and neutral amino acids in a transport system.
J. Biol. Chem. 246, 1682-1688 (1971)

59. TRENDELENBURG, U., MUSKUS, A., FLEMING, W. M., GOMEZ, B.:
Effect of cocaine, denervation and decentralization on the response of nictitating membrane to various sympathomimetic amines.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 138, 181-193 (1962)

60. WHEELER, K. P., INUI, Y., HOLLENBERG, P. F., EAVENSON, E., CHRISTENSEN, H. N.:
Relation of amino acid transport to sodium-ion concentration.
Biochim. Biophys. Acta 109, 622-625 (1965)

61. WHITBY, L. G., AXELROD, J., WEIL-MALHERBE, H.:
The fate of H^3-norepinephrine in animals.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 132, 193-201 (1961)

62. WHITE, T. D., PATON, D. M.:
Effects of external Na^+ and K^+ on the initial rates of noradrenaline uptake by synaptosomes prepared from rat brain.
Biochim. Biophys. Acta 266, 116-127 (1972)

63. WILKINSON, G. N.:
Statistical estimation in enzyme kinetics.
Biochem. J. 80, 324-332 (1961)

64. WINNE, D.:
Zur Auswertung von Versuchsergebnissen:
Die Prüfung, ob Kurven sich in ihrem Verlauf unterscheiden.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch., Pharmacol. 250, 383-396 (1965)

65. WOLFE, E. D., POTTER, L. T., RICHARDSON, K. C., AXELROD, J.:
Localizing tritiated norepinephrine in sympathetic axons by electron micrograph autoradiography.
Science 138, 440-442 (1962)

66. ZIEHER, L. M., JAIM-ETCHEVERRY, G.:
Regional variations in the distribution of noradrenaline along the rat vas deferens.
J. Pharm. Pharmac. 23, 61-63 (1971)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Privatdozenten Dr. med. Karl-Heinz Graefe für die Überlassung des Themas sowie für seine freundliche und geduldige Beratung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche und der Ausarbeitung des Manuskripts danken, ebenso Herrn Professor Dr. med. U. Trendelenburg für seine ständige Bereitschaft zu Rat und Diskussion.

Allen Mitarbeitern im 2. Stockwerk des Pharmakologischen Instituts bin ich für die freundliche Atmosphäre dankbar, in der es mir Freude gemacht hat, mit ihnen zusammen zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Karin und Marianne Babl für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Versuche sowie Ingrid Heinritzi für ihre Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen.

Ebenso danke ich meinen Eltern, die mir das Medizinstudium und den Druck dieser Arbeit ermöglichten.

L e b e n s l a u f

Am 15. Dezember 1952 wurde ich als erstes Kind des Beamten Helmut Sammet und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Heydemann, in Rehau, jetzt Kreis Hof/Saale, geboren.

Nach der Obersiedlung nach Bayreuth, wo meine beiden Geschwister zur Welt kamen, besuchte ich ab 1959 die Volksschule Bayreuth-St. Georgen. 1963 trat ich in das Graf-Münster-Gymnasium über, wo ich 1972 das Abitur im neusprachlichen Zweig ablegte. Im Wintersemester 1972/73 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg, das ich am 3. Mai 1979 mit dem 3. Teil der Ärztlichen Prüfung abschloß.

Meine Frau Karin, geb. Müller, und ich heirateten am 28. März 1974. Ab Februar 1975 arbeitete ich an der vorliegenden Dissertation. Seit Juli 1979 leiste ich meinen Wehrdienst als Truppenarzt bei der Bundeswehr.

Gerbrunn, den 1. 12. 1979

Stefan Sammet

Stefan Sammet